

# UČINAK REKOMBINANTNOG ERITROPOETINA NA EKSPRESIJU I AKTIVNOST SIRT1 U MOZGU ŠTAKORA S EKSPERIMENTALNIM DIJABETESOM

---

Lovrić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:250552>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lovrić Lucija

**UČINAK REKOMBINANTNOG ERITROPOETINA NA EKSPRESIJU I  
AKTIVNOST SIRT1 U MOZGU ŠTAKORA S EKSPERIMENTALNIM  
DIJABETESOM**

Diplomski rad

Rijeka, 2021

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lovrić Lucija

**UČINAK REKOMBINANTNOG ERITROPOETINA NA EKSPRESIJU I  
AKTIVNOST SIRT1 U MOZGU ŠTAKORA S EKSPERIMENTALNIM  
DIJABETESOM**

Diplomski rad

Rijeka, 2021

Mentor rada: **prof. dr. sc. Jasenka Mršić-Pelčić, dr.med.**

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_ literaturnih navoda.

*Voljela bih zahvaliti osobama koje su zaslužne za nastanak ovog diplomskog rada, ali i onima koji su mi omogućili, na ovaj ili onaj način, da stignem do završetka svog studija.*

*Najprije želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasenki Mršić-Pelčić, dr. med., zbog koje sam odabrala Zavod za farmakologiju i ovu temu za moj diplomski rad. Hvala joj što je sa mnom podijelila svoja znanja, udijelila korisne savjete i usmjerila me u svakom koraku nastanka ovog rada.*

*Također se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Kristini Pilipović, dr. med. na dostupnosti, udijeljenim savjetima te svakoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Prilikom mog istraživačkog rada u laboratoriju su veliku ulogu igrale Nika Gržeta, mag. bioteh. u med. i Marina Jakovac, med. lab. ing., koje su bile dostupne za svaku pomoć koja mi je bila potrebna, a zaslužne su i za širenje pozitivne energije tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada, zato im jedno veliko hvala.*

*I na kraju, od srca želim zahvaliti svojim roditeljima, sestri i bratu, koji su vjerovali u mene i moj uspjeh kada i sama nisam. Hvala na strpljenju, razumijevanju i neprestanoj potpori!*

## SAŽETAK

Dijabetes (*Diabetes mellitus*) je ozbiljna, za sada neizlječiva, kronična bolest koja je okarakterizirana hiperglikemijom kao i poremećajima u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. U zadnja dva desetljeća se drastično povećala incidencija ove bolesti, pretežito kod osoba starije dobne skupine, ali ne zaobilazi niti mlađu populaciju. Upravo zbog toga je sve više istraživanja usmjereno na razvoj novih, dostupnijih i učinkovitijih metoda terapijskog liječenja.

U ovom diplomskom radu je ispitan učinak rekombinantnog humanog eritropoetina (rhEPO) na ekspresiju i aktivnost SIRT1 proteina (engl. *silent information regulator two protein 1*), ekspresiju proBDNF i mBDNF proteina kao i na I $\kappa$ B $\alpha$  protein u parijatalnom korteksu i/ili hipokampusu štakora s eksperimentalnim dijabetesom. Hannover Wistar štakorima muškog spola je izazvan dijabetes primjenom pojedinačne injekcije streptozotocina (STZ). Dio životinja koje su razvile dijabetes primile su rhEPO (40  $\mu$ g/kg tjelesne težine) (Diab/EPO) ili otapalo (Diab) četiri dana uzastopno. Kontrolnu skupinu sačinjavale su zdrave, netretirane životinje. Dobiveni rezultati pokazuju da je primjena rhEPO izazvala statistički značajan porast ekspresije SIRT1 proteina u mozgovima štakora s eksperimentalnim dijabetesom u korteksu i hipokampusu u usporedbi sa kontrolnom skupinom štakora i skupinom štakora tretiranih s otapalom (Diab). Zabilježen je i statistički značajan porast ekspresije proBDNF, ali ne i mBDNF proteina u parijetalnom korteksu životinja. Ekspresija proteina I $\kappa$ B $\alpha$  je porasla kod skupine životinja tretiranih s rhEPO, ali dobiveni podaci nisu statistički značajni.

Ključne riječi: dijabetes, eritropoetin, SIRT1, neuroprotekcija, štakori

## SUMMARY

Diabetes mellitus is a serious, incurable, chronic disease characterised by hyperglycaemia and disorders in the metabolism of carbohydrates, fats and proteins. The incidence of this disease has increased drastically over the past decades, mostly in the elderly, but it does not bypass the younger population. Therefore, more and more research is focused on the development of new, more accessible and more efficient ways of therapeutic treatment. The effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on expression and activity of SIRT1 protein (silent information regulator two protein 1), proBDNF and mBDNF protein expression as well as on I $\kappa$ B $\alpha$  protein in the parietal cortex and/or hippocampus of rats with experimental diabetes were researched in this study. Diabetes mellitus in Hannover Wistar male rats was caused by single injection of streptozotocin (STZ). Some of the animals that developed diabetes mellitus received either rhEPO (40  $\mu$ g/kg body weight) (Diab/EPO) or solvent (Diab) for four consecutive days. The control group consisted of healthy, untreated animals. The results showed that the use of rhEPO induced a statistically significant increase in SIRT1 protein expression in the brains of rats with experimental diabetes in the cortex and hippocampus compared to the control group of rats and the solvent treated group of rats (Diab). There was also a statistically significant increase in proBDNF expression, but not of mBDNF protein in the parietal cortex of animals. I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression increased in the group of animals treated with rhEPO, but the data obtained are not statistically significant.

Key words: diabetes mellitus, erythropoietin, SIRT1, neuroprotection, rats

# SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja .....	1
1.1. Definicija dijabetesa.....	1
1.1.1. Dijabetes tip I.....	2
1.1.2. Dijabetes tip II.....	3
1.1.3. Gestacijski dijabetes.....	4
1.1.4. Specifični tipovi dijabetesa .....	4
1.2. Utjecaj dijabetesa na mozak.....	5
1.3. Epidemiologija .....	8
1.4. Ispitivanje neuroprotektivnih lijekova .....	10
1.4.1 Eksperimentalni modeli dijabetesa .....	10
1.4.2 Eritropoetin .....	11
1.4.3. SIRT1 .....	13
1.4.4. BDNF.....	15
1.1.5. I $\kappa$ B $\alpha$ .....	16
2. Cilj istraživanja .....	17
3. Materijali i metode.....	18
3.1 Eksperimentalne životinje.....	18
3.2 Eksperimentalni model dijabetesa .....	18
3.3 Priprema tkiva.....	19
3.4 Imunoprecipitacija .....	19
3.5. Western blot analiza.....	19
3.6. Kvantifikacija proteina.....	20
3.7. Prikupljanje i obrada podataka.....	21
4. Rezultati .....	22



4.1. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora s eksperimentalnim dijabetesom.....	22
4.2. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost proBDNF i mBDNF proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom.....	25
4.3. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost I $\kappa$ B $\alpha$ proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom.....	28
5. Rasprava.....	30
5.1. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora s eksperimentalnim dijabetesom.....	30
5.2. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost proBDNF i mBDNF proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom.....	31
5.3. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost I $\kappa$ B $\alpha$ proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom.....	32
6. Zaključak.....	33
7. Literatura.....	34
8. Popis skraćenica i akronima.....	40
9. Životopis.....	42

## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

### 1.1. Definicija dijabetesa

Dijabetes (*Diabetes mellitus*) je ozbiljna, za sada neizlječiva, kronična bolest od koje oboljevaju osobe svih dobnih skupina, neovisno o spolu. Karakterizirana je poremećajima u metabolizmu ugljikohidrata, masti i bjelančevina te hiperglikemijom, odnosno povećanom koncentracijom glukoze (šećera) u krvi zbog čega se često naziva i šećernom bolesti. Normalna koncentracija glukoze u krvi se kreće u intervalu od oko 3,1 do 6,1 mmol/L. Dijagnoza šećerne bolesti postavlja se određivanjem koncentracija glukoze ako je glukoza u plazmi natašte (GUP nt) u dva različita mjerenja veća od 7,0 mmol/l ili slučajnim uzorkom određena u dva različita mjerenja postprandijalno (GUP pp) veća od 11,1 mmol/l ili nakon drugog sata OGTT-a (testa opterećenja glukozom sa 75 g suhe glukoze s 2 dcl vode) veća od 11,1 mmol/l, radi se o šećernoj bolesti. (1) Kronična hiperglikemija negativno utječe na gotovo sve organe u ljudskom tijelu, a najviše zahvaća i ostavlja vrlo opasne posljedice na očima, bubrezima, živcima, srcu i krvnim žilama. Kod pacijenata oboljelih od dijabetesa do hiperglikemije dolazi zbog nedovoljno dobro kontrolirane prehrane, propustima kod inzulinske terapije, neregulirane fizičke aktivnosti ili kao rezultat popratnih akutnih bolesti (upala grla, sinusa, pluća...). Osim toga, dijabetes je jedan od deset vodećih uzroka smrti u Republici Hrvatskoj, a na vrlo visokom mjestu je i u svijetu, zbog čega se smatra javnozdravstvenim problemom. Neki od ranih znakova šećerne bolesti mogu biti učestalo mokrenje, pojačana žeđ i glad, neobjašnjiv gubitak tjelesne težine/prekomjerna tjelesna težina, umor, usporeno zarastanje rana...

Dijabetes klasificiramo u četiri različite skupine, ovisno o načinu nastanka:

1. Dijabetes tip I - nastaje uslijed destrukcije beta-stanica gušterače
2. Dijabetes tip II - nastaje uslijed progresivnog gubitka sekrecije inzulina zbog inzulinske rezistencije (2)
3. Gestacijski dijabetes - nastaje u trudnoći
4. Specifični tipovi dijabetesa - razni oblici šećerne bolesti uzrokovani monogenским greškama u sintezi i izlučivanju inzulina (3)

### 1.1.1. Dijabetes tip I

Oštećenje beta-stanica gušterače ili bolesti koje dovode do smanjivanja izlučivanja inzulina mogu rezultirati pojavom dijabetesa tip I ili šećerne bolesti tip I, koja je još poznata i po nazivu „dijabetes ovisan o inzulinu“. Približno 5 do 10% pacijenata oboljelih od dijabetesa ima upravo ovaj oblik. To je autoimuna bolest koju karakterizira uništavanje beta-stanica Langerhansovih otočića gušterače, što naposljetku dovodi do potpunog gubitka inzulina. Najčešće se razvija u dječjoj i mladenačkoj dobi, zbog čega se ranije nazivao i „juvenilni dijabetes“, međutim nije isključeno da se može pojaviti i kod odraslih osoba (kasni autoimuni dijabetes zrele dobi). Kod nastanka u mladenačkoj dobi postoje dva vrška incidencije: u dobi od 5 do 7 godina, kada djeca polaze u školu što nosi povećanu izloženost djeteta infektivnim čimbenicima te pubertetska dob kada dolazi do pojačanog lučenja spolnih hormona i hormona rasta (koji su antagonisti inzulina), kao i zbog emocionalnog stresa koji je karakterističan za tu dob. (4) Iako čimbenici nastanka nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da bi uzrok mogli biti već spomenuti okolišni faktori (stres, virusne infekcije...) ili kombinacija nasljednih i okolišnih faktora. (6) Najvažniji okolišni faktori za koje se smatra da posreduju u autoimunom oštećenju beta-stanica gušterače su enterovirusi i antigeni kravljeg mlijeka, a moguće da u te čimbenike ulazi i manjak vitamina D. Pacijenti koji imaju genetsku predispoziciju za nastanak bolesti u trenutku rođenja imaju očuvane beta-stanice gušterače, ali zbog autoimunskih zbivanja dolazi do njihova razaranja. (5) Nastanak bolesti se uglavnom odvija vrlo naglo, u roku od nekoliko dana ili tjedana gdje dolazi do povećanja razine glukoze u krvi, povećanja iskorištavanja masti za energiju i iscrpljivanja tjelesnih bjelančevina. To rezultira pojavom simptoma kao što su prekomjerna i učestala glad i žeđ i potreba za slatkim i hladnim pićima, suhoća usta, učestalo mokrenje, izrazit umor i manjak energije, nagli gubitak težine, smetnje vida i ponavljane infekcije.

Liječenje se zasniva na inzulinskoj terapiji. U bolesnika sa šećernom bolesti tipa I, u kojih nema endogene sekrecije inzulina, potrebno je intenzivirano liječenje u obliku bazal bolus terapije. Preporučuje se kombinacija ultra kratko djelujućih inzulinskih analoga neposredno prije glavnih obroka uz 1-2 doze dugodjelujućeg inzulinskog analoga. (13) Osim toga, može se upotrijebiti i inzulinska pumpa. Uz inzulinsku terapiju, važno je da pacijenti imaju pravilnu prehranu i dobro organiziranu tjelesnu aktivnost koja je individualna za svakog pacijenta ovisno o životnom ritmu i sl.

### 1.1.2. Dijabetes tip II

Dijabetes tip II nije autoimuna bolest kao dijabetes tip I i beta-stanice gušterače kod pacijenata nisu uništene, već su postojane, ali oštećene i ne luče inzulin adekvatno. Također, problem se javlja i kod ciljanih stanica nekih organa (jetra, mišići...) koje imaju smanjenu osjetljivost na inzulin. Odnosno, šećerna bolest tip 2 heterogena je skupina oboljela koju karakteriziraju različiti stupnjevi inzulinske rezistencije, poremećeno djelovanje i/ili lučenje inzulina uz uvećanje proizvodnje glukoze u jetri procesom glukoneogeneze (17). Ovaj oblik dijabetesa je najzastupljeniji i od njega boluje oko 90% pacijenata oboljelih od šećerne bolesti. Iako uzrok nije u potpunosti utvrđen, kao niti kod prethodno spomenutog dijabetesa tip I, smatra se da je rezultat kombinacije nekih rizičnih faktora kao što su debljina, tjelesna neaktivnost i slični stilovi života kao i, naravno, okolišni čimbenici. Osim toga, ovaj tip se povezuje i sa starijom dobi (rizičnija skupina su osobe iznad četrdeset godina starosti) pa se iz tog razloga prije nazivao i „adultni dijabetes“. Genetika je još jedan od faktora koji utječu na pojavu dijabetesa tip II, često se nalazi u pojedinoj obitelji i nasljeđuje se autosomno dominantno. (17) Simptomi su manje izraženi nego kod šećerne bolesti tip 1 zbog čega dolazi do problema u dijagnosticiranju same bolesti. Najčešće se otkrije sasvim slučajno tijekom obrade zbog nekih drugih bolesti ili tek nakon što se već razviju kronične komplikacije. U tom slučaju nije moguće krenuti s pravovremenom terapijom što uvelike smanjuje djelotvornost liječenja.

Pod liječenjem dijabetesa tipa II smatra se najprije uklanjanje simptoma vezanih uz hiperglikemiju kao i eliminacija (ili barem redukcija) kroničnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija dijabetesa što bi u konačnici doprinijelo normalnom načinu života pacijenta. (19) Pozitivno je što se ova bolest uglavnom može držati pod kontrolom ukoliko se oboljelog educira o pravilnoj prehrani i tjelovježbi primjerenom za njegovo stanje. Ključno je da oboljeli prihvati i aktivno sudjeluje u kontroli bolesti. Kako je hiperglikemija najozbiljnija komplikacija dijabetesa, najvažnije je kontrolirati razinu šećera u krvi. Samo kontrola glukoze u plazmi bolesniku omogućuje prikaz trenutnog stanja glikemije što je važno kako bi mogli pratiti djelotvornost terapije i pravovremeno reagirati u slučaju poremećaja razine glukoze. Kada se procijeni da je pacijentu potrebno uvesti farmakoterapiju, najprije se krene s uzimanjem peroralnih lijekova, a potom se prelazi na inzulin. Inzulin se može uzimati u dvije forme: dugodjelujući i kratkodjelujući regularni inzulin. Dugodjelujući inzulin osigurava konstantni, „osnovni“ nivo inzulina u sistemskej cirkulaciji, dok se kratkodjelujući

regularni inzulin uzima kad šećer u krvi poraste, za vrijeme obroka. Ovakav način uzimanja inzulina je sličan njegovoj sekreciji u organizmu, a konačni cilj je izbjeći velike oscilacije u razini glukoze. Neki pacijenti uzimaju inzulin putem implantirane pumpice.

### **1.1.3. Gestacijski dijabetes**

Gestacijski dijabetes se prvi puta javlja ili dijagnosticira u trudnoći, i to u drugom ili trećem trimestru trudnoće jer u tom razdoblju raste potreba za inzulinom. Nastaje zbog nedostatne funkcije gušterače u stanju inzulinske rezistencije povezane s hormonalnim promjenama u trudnoći. Iako se kod svih trudnica javlja inzulinska rezistencija, većina može kompenzirati pojačano lučenje inzulina i pritom zadržati normalnu razinu glukoze u krvi, međutim neke žene ne posjeduju tu mogućnost te se kod njih javlja intolerancija na glukozu i oboljevaju od gestacijskog dijabetesa. (21) Najčešći je metabolički poremećaj u trudnoći i kao takav nosi povećan rizik za razvoj komplikacija pri porodu te dugoročno povećan rizik razvoja šećerne bolesti u majke i njezina potomstva. (20) Najznačajniji rizični čimbenici razvoja gestacijskog dijabetesa su dob i pretilost trudnice, a veći rizik je i kod trudnica čije su majke oboljele od dijabetesa tipa II. Samo promjena životnog stila, odnosno regulacija prehrane i redovita tjelesna aktivnost, može rezultirati zadovoljavajućom regulacijom glukoze u 80 – 90 % trudnica s gestacijskim dijabetesom. Ako to pak nije dovoljno, uvodi se farmakoterapija. Kao primarni lijek se preporučuje inzulin, budući da za primjenu oralnih anti hiperglikemika, unatoč ispitivanjima koji ukazuju na njihovu učinkovitost i sigurnost kod kratkotrajne primjene, još nema dovoljno podataka o dugoročnoj sigurnost. (19)

### **1.1.4. Specifični tipovi dijabetesa**

U skupinu specifičnih tipova dijabetesa ulazi “monogeniski dijabetes” i tip dijabetesa koji se nekada nazivao “sekundarni dijabetes”. Monogeniski dijabetes, za razliku od prethodno spomenutih tipova iste bolesti, ne nastaje pod utjecajem nekoliko gena i okolišnih faktora, već kao što se može vidjeti iz naziva - rezultat je promjena na jednom genu. Odnosno, uzrok su genetski defekti funkcije beta-stanica gušterače. Taj pojam obuhvaća širok spektar rijetkih bolesti i poremećaja povezanih s dijabetesom; privremeni neonatalni dijabetes (TNDM), trajni neonatalni dijabetes (PNDM) i dijabetes zrele dobi kod mladih, poznatiji kao MODY (engl. *Maturity-onset diabetes of the young*). Neonatalni diabetes mellitus (NDM) rijetka je monogenska forma dijabetesa koja se klinički prezentira većinom do 6. mjeseca života. Kod

trajnog neonatalnog dijabetesa (PNDM) liječenje je nužno provoditi tijekom cijeloga života, a kod privremenog neonatalnog dijabetesa (TNDM) nakon nekoliko tjedana ili mjeseci liječenja inzulinom dolazi do remisije bolesti. Pretpostavlja se da će oko 50% oboljelih doživjeti relaps bolesti najčešće tijekom adolescencije ili u ranoj odrasloj dobi. (25)

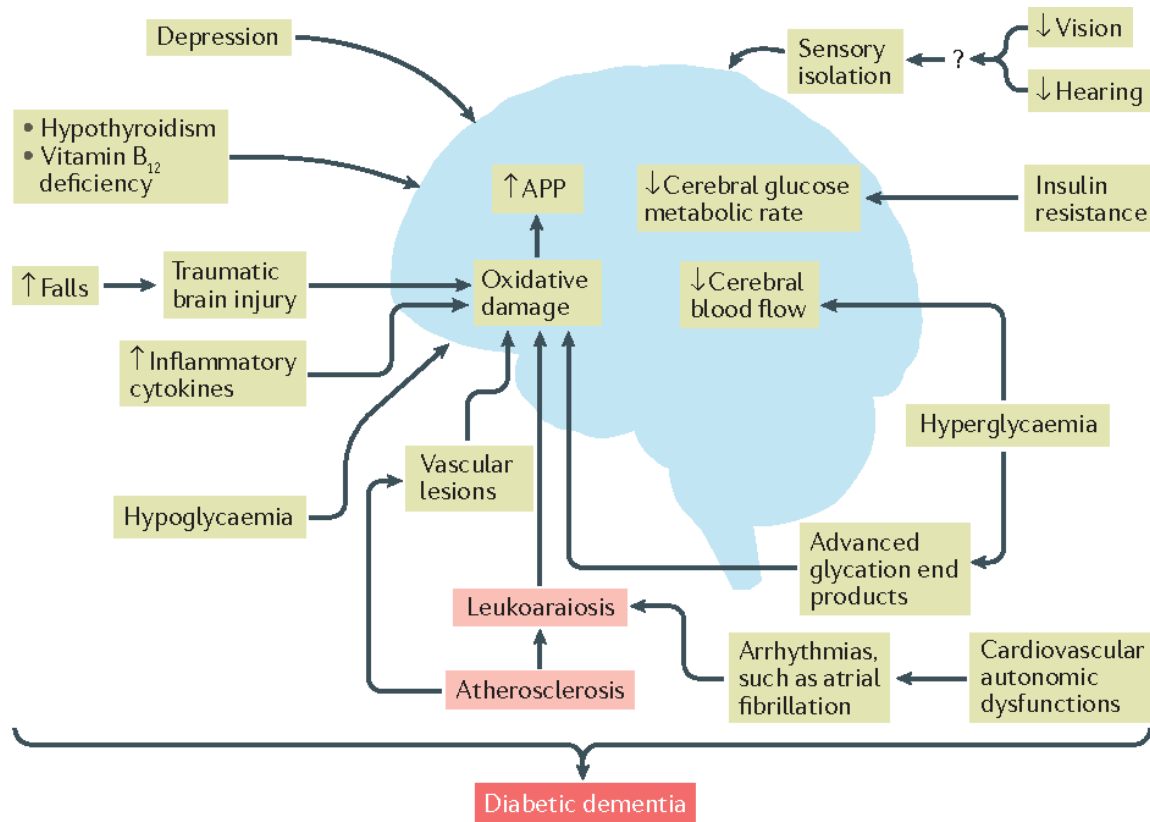
MODY je također vrlo rijedak oblik dijabetesa od kojeg obolijeva svega 1-2% populacije. Nastaje zbog već spomenutog poremećaja rada Langerhansovih otočića u gušterači zbog čega dolazi do poremećaja lučenja inzulina s minimalnim ili bez defekata u njegovom djelovanju. Do sada je otkriveno trinaest različitih podtipova MODY-a uzrokovanih mutacijama trinaest različitih gena. Podtipovi se razlikuju po prevalenciji, težini bolesti i ozbiljnosti nastanka popratnih komplikacija. Važno je pravilno i na vrijeme otkriti da se radi upravo o ovakvom tipu dijabetesa kako bi se pristupilo primjerenom pristupu liječenja te kako bi se otkrili eventualni asimptomatski članovi obitelji, obzirom da se nasljeđuje autosomno dominantno.

Oblik bolesti koji se smatra pod pojmom „sekundarni dijabetes“ zapravo nastaje kao posljedica raznih bolesti i stanja kao što su primjerice bolesti egzokrinog dijela gušerače (pankreatitis, cistična fibroza, hemokromatoza...), endokrinopatije (Cushingov sindrom, hipertiroidizam, akromegalija...) ili uzrokovan lijekovima i kemikalijama (alfa/beta adrenergički agonisti, tireoidni hormoni, glukokortikoidi), infekcijama (citomegalovirus...) te drugim genetskim sindromima (Downov sindrom, Turnerov sindrom...). (24)

## 1.2. Utjecaj dijabetesa na mozak

Dijabetes se povezuje s pojavnosti mikrovaskularnih komplikacija kao što su primjerice neuropatija i retinopatija te je njegov štetan utjecaj na živčani sustav, oči i kardiovaskularni sustav vrlo dobro istražen. Međutim, od otkrića inzulina (Miles & Root 1922) je primijećeno da dijabetes može imati veliku ulogu i u nastanku kognitivne disfunkcije kod bolesnika. Nakon te spoznaje, mnoga su se istraživanja usredotočila upravo na to te je 1950. godine nastao izraz „dijabetička encefalopatija“ (R. DeJong). Taj naziv je najprije bio prihvaćen, ali kasnije i odbačen zbog negativne konotacije i još nekoliko razloga te je predložen novi naziv: „kognitivni pad povezan s dijabetesom“ (engl. *diabetes-associated cognitive decline* - DACD). (35) Kognitivnu disfunkciju izazvanu dijabetesom karakterizira

zmanjena mentalna brzina i fleksibilnost prema čemu se zaključuje da dijabetes povećava rizik za nastanak Alzheimerove bolesti ili drugih tipova demencije.



**Slika 1.** Ilustrirani prikaz mozga i procesa koji se događaju u mozgu dijabetičara. Oštećenja u mozgu osoba s dijabetesom mogu dovesti do demencije. Glavni uzroci koji mogu izazvati takvu demenciju kod osoba oboljelih od dijabetesa tip II su istaknuti na ovoj slici. Mogu se podijeliti na: oksidativna oštećenja, kao primjerice pojačani produkti glikacije, ateroskleroza, aritmija, smanjen protok krvi u mozgu izazvan hiperglikemijom, smanjen cerebralni metabolizam zbog inzulinske rezistencije i na reverzibilne uzroke kao što su hipotireoza, nedostatak vitamina B12 i depresija. APP, amiloidni prekursorski protein (engl. *amyloid precursor protein*). Izvor slike: (37)

Uobičajena teorija za starenje mozga i patogenezu ovakve cerebralne disfunkcije kod osoba s dijabetesom se odnosi na staničnu smrt od oksidativnog stresa posredovanog slobodnim radikalima. Hiperglikemija smanjuje razinu antioksidansa i istovremeno povećava proizvodnju slobodnih radikala. Ti događaji doprinose oštećenju tkiva što dovodi do promjene redoks potencijala stanice s naknadnom aktivacijom redoks-osjetljivih gena. (34) Oksidativni

stres i njegova oštećenja uzrokuju povećanje proizvodnje upalnih citokina koja može povećati razinu amiloidnog prekursorskog proteina kao i taloženje amiloida- $\beta$ , dakle ubrzavanje patologije Alzheimerove bolesti. Hiperglikemija također dovodi do smanjenja cerebralnog protoka krvi i hipoksije mozga što rezultira smanjenom moždanom funkcijom. Ponovljene epizode hipoglikemije dovode do neurološkog oštećenja mozga pa bolesnici s dijabetesom imaju povećanu vjerojatnost od pada što može dovesti do traumatske ozljede mozga s povećanim oksidativnim oštećenjima i razinom amiloidnog prekursorskog proteina. Inzulin sudjeluje kod unosa glukoze u hipokampus, regiju mozga koja je ključna za formiranje pamćenja, a osobe s rezistencijom na inzulin imaju smanjen cerebralni metabolizam glukoze što predstavlja smanjenje rada moždane funkcije. (37) Kod pacijenata oboljelih od dijabetesa također je više vjerojatno da će doći do oštećenja vida i gubitka sluha što dovodi do senzorne izolacije i kognitivne disfunkcije. Također, kod tih osoba je i vjerojatnije da će imati hipotireozu i/ili nedostatak vitamina B12 što je oboje povezano s kognitivnom disfunkcijom.



### 1.3. Epidemiologija

Dijabetes se naziva i globalnom epidemijom iz razloga što je broj oboljelih osoba u cijelom svijetu u zadnjih petnaestak godina naglo porastao i uočljivo je da se iz godine u godinu sve više povećava. Prema podacima IDF Diabetes Atlasa iz njegovog devetog izdanja koji obuhvaća podatke iz 2019. godine (deseto izdanje će biti objavljeno ove godine), u kojem je obrađeno 211 država i teritorija, 351.7 milijuna ljudi u rasponu od 20 do 64 godine, a 135.6 milijuna ljudi u rasponu od 65-99 godina boluje od dijabetesa, što je ukupno 487.3 milijuna zabilježenih slučajeva u svijetu. S razlogom se ova bolest smatra globalnim i javnozdravstvenim problemom, obzirom da se u slučaju nastavka povećanja trenda ovom brzinom, očekuje da će do 2030. godine broj pacijenata doći do 612.5 milijuna, a do 2045. godine se očekuje čak 762.3 milijuna oboljelih. (22)

Promatrano na razini godina starosti, prevalencija je najniža kod mlađih osoba (20-24 godina) te se u kasnijim godinama povećava i najviša je kod osoba od 70 do 74 godine. Ako promatramo razliku između spolova, nešto viša prevalencija je kod muškaraca nego kod žena, okvirno sedamnaest milijuna muškaraca nego žena je živjelo s dijabetesom 2019. godine.

Kina (116.4 milijuna), Indija (77.0 milijuna) i Sjedinjene Američke Države (31.0 milijun) prednjače po broju oboljelih (20 - 75 godina starosti) u svijetu, a sličan poredak se očekuje i za 2030. i 2045. godinu, s Kinom i Indijom i dalje na prvom i drugom mjestu, a za Pakistan se očekuje da će preći Sjedinjene Američke Države i zauzeti treće mjesto.

Kao i kod odraslih, broj djece i adolescenata oboljelih od dijabetesa se iz godine u godinu povećava. U Europi gotovo svi slučajevi su oboljeli od dijabetesa tip I, dok je u drugim populacijama ipak više zastupljen dijabetes tip II u ovoj dobnoj skupini. Ukupno je 1,110,100 djece/adolescenata mlađih od dvadeset godina oboljelih od dijabetesa tipa I u 2019. godini. Zabilježeno je povećanje pacijenata te dobi s dijabetesom tip II u nekim državama i za isti se očekuje da će postati sve veći problem zbog toga što se djeca/mladi sve manje fizički aktivni te je sve više pretila djece/mladih što je jedan od rizičnih faktora za razvoj ove bolesti. (22)

Od ukupnog broja oboljelih 2019. očekivalo se da će prosječno 4.2 milijuna slučajeva završiti smrtnim ishodom. Gotovo polovina (46.2%) od tih slučajeva su osobe mlađe od 60 godina.

Prema izvješćima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz podataka izvučenih iz CroDiab registra i Centralnog zdravstvenog informacijskog sustava (CEZIH), u 2019. je godini registrirano 315.298 punoljetnih osoba s dijagnozom šećerne bolesti u Republici Hrvatskoj. Tijekom 2019. godine je zabilježeno još najmanje 96.349 prijavi novih bolesnika. Za

Republiku Hrvatsku su poznati podaci iz CroDiab-a i za 2020. godinu, gdje je registrirano sveukupno 310.212 osoba sa šećernom bolesti, a pristiglo je tijekom godine još 81.114 novih prijava. Procjenjuje se da je broj oboljelih od dijabetesa i puno veći, oko 534.000, ali da je samo 58% slučajeva otkriven. (23)

## 1.4. Ispitivanje neuroprotektivnih lijekova

### 1.4.1 Eksperimentalni modeli dijabetesa

U mnogim istraživanjima, pa tako dijabetesa, u širokoj primjeni su animalni modeli. U takvim modelima je moguće *in vivo* kontrolirati genetske i okolišne čimbenike za koje se smatra da dovode do razvoja bolesti i tako ih proučavajući doći do novih spoznaja koje se mogu primijeniti prilikom liječenja ili prevencije bolesti kod pacijenata.

Za indukciju dijabetesa kod životinja se koriste razni modeli, ovisno o ciljevima ispitivanja. Od 1880. godine kada su von Mering i Minkowski odstranili gušteraču kod psa koji je tada pokazivao simptome dijabetesa i u ostalim ranim istraživanjima se primjenjivala pankreatektomija, odnosno odstranjivanje gušterače, na psima, štakorima, miševima i zečevima. U današnje vrijeme se ispitivanja najčešće izvode na glodavcima iz razloga što su genetski slični ljudima, imaju visok reproduktivni potencijal, životni vijek im je kratak i jeftiniji su za održavanje, iako ni danas nisu isključeni drugi animalni modeli u eksperimentima.

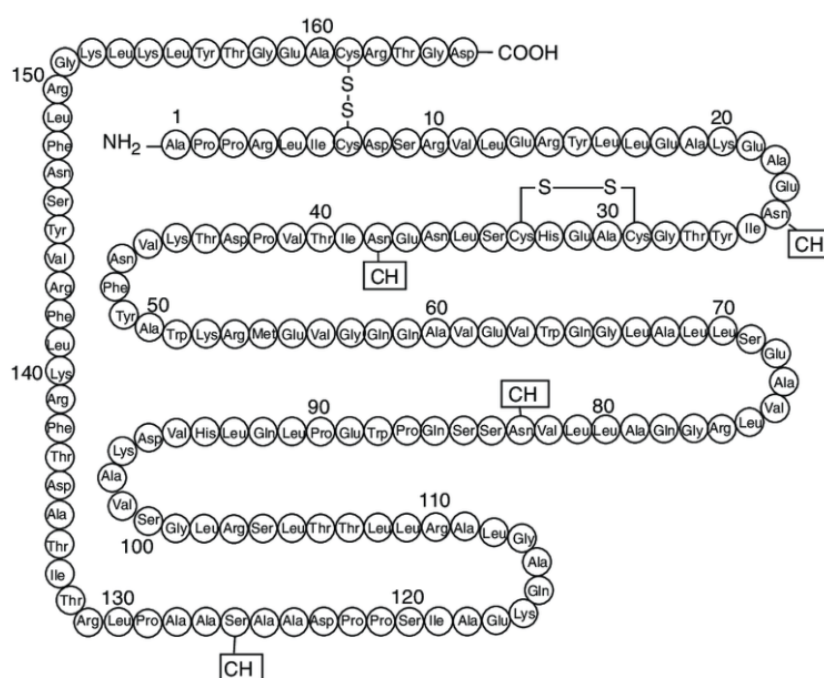
Hiperglikemija se na životinjama može izazvati kirurškim postupcima, već spomenutim potpunim odstranjivanjem gušterače ili dijela gušterače (parcijalna pankreatektomija) ili nekirurškim postupcima, odnosno ubrizgavanjem različitih dijabetogenih spojeva od kojih su najpoznatiji aloksan, streptozotocin, vakor, ditizon i 8-hidroksikvinolon. (28)

Kod animalnih modela dijabetesa tip I najčešće se koristi streptozotocin koji je izoliran iz bakterije *Streptomyces achromogenes*. On djeluje na način da ometa transport glukoze, djelovanje glukokinaze i inducira lomove DNA uzvojnice. (27) Izvor je slobodnih radikala koji mogu doprinijeti oštećenju DNA i u konačnici dovesti do stanične smrti. Može se primijeniti jednokratno u većoj količini ili višekratno u manjim dozama. (26)

Animalni modeli dijabetesa tip II su kompleksniji i heterogeniji, približno kao i kod ljudskog stanja. Kod nekih prevladava rezistencija na inzulin, a kod nekih poremećaj rada beta-stanica gušterače. Često se modeli za ovaj tip dijabetesa zasnivaju na pretilosti kako bi bili u korelaciji sa stanjem kod oboljelih ljudi. Tako se animalnim modelima mijenja prehrana, odnosno uvodi se prehrana s povećanim udjelom lipida što može dovesti do pretilosti, hiperinzulinemije i promijena u homeostazi glukoze što dovodi do nemogućnosti uspostavljanja homeostaze od strane beta-stanica gušterače. (26) Osim toga, moguće je koristiti i dijabetogene spojeve kao i kod modela dijabetesa tip I. Primjena streptozotocina u štakora uzrokuje dijabetes tipa II s učestalošću od 78-80%. (26)

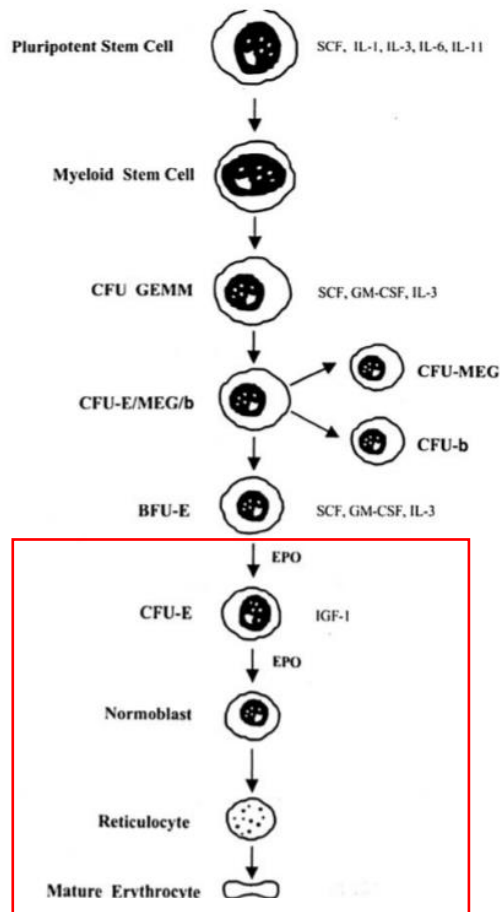
## 1.4.2 Eritropoetin

Hematopoetski hormon eritropoetin (EPO) je glikoprotein koji pripada obitelji citokina tip I. Primarna uloga mu je regulacija eritropoeze te je zaslužan za pokretanje proizvodnje oko dvjesto milijardi crvenih krvnih stanica dnevno. Izrazito je specifičan za eritroidne i progenitorne stanice. Veže se za EPO-receptore (EpoR) na spomenutim stanicama čime potiče njihovo preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju u zrele eritrocite. (29) Primarno se proizvodi u jetri novorođenčadi i bubrezima odraslih osoba. Molekularna masa mu iznosi 30kDa, a sastoji se od slijeda od 165 aminokiselina.



**Slika 2.** Primarna struktura eritropoetina (EPO). *Izvor slike:* (59)

Eritropoezu (proces stvaranja crvenih krvnih stanica) regulira nekoliko citokina. Neki od najvažnijih faktora rasta u tom procesu su: interleukin (IL)-6, faktor matičnih stanica (SCF), IL-1, IL-3, IL-4, IL-9, IL-11, granulocit-makrofag (GM)-CSF, inzulin faktor rasta-1 (IGF-1) i, naravno, eritropoetin (EPO). (33) Prema pojednostavljenom ilustriranom prikazu procesa eritropoeze od primitivne pluripotentne matične stanice do zrelog eritrocita (Slika 2.) je vidljivo u kojem trenutku koji od navedenih faktora rasta najviše djeluje. EPO djeluje u kasnijim fazama razvoja eritroidne progenitorne stanice i to primarno na jedinicu za stvaranje kolonija eritroida (CFU-E) kako bi potaknuo proliferaciju i sazrijevanje od normoblasta preko retikulocita do zrele crvene krvne stanice.



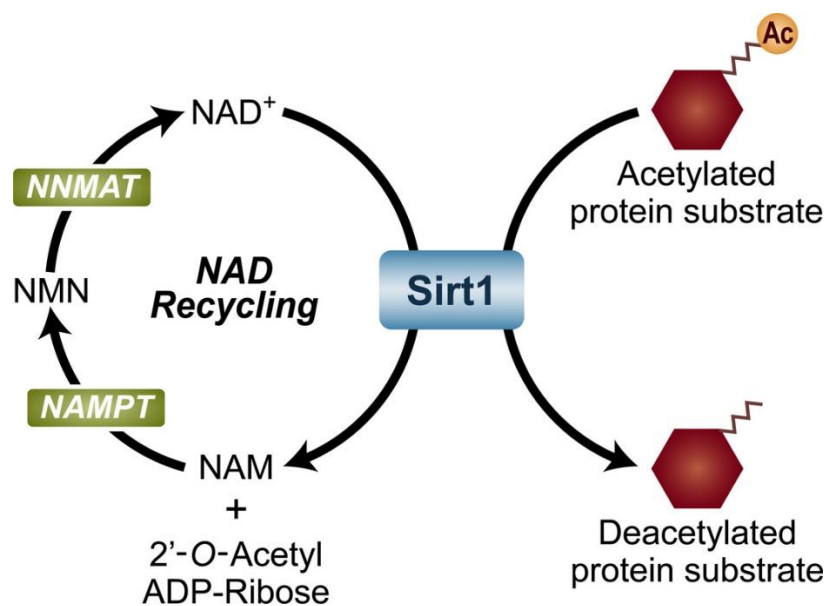
**Slika 3.** Ilustrirani prikaz eritropoeze od pluripotentne matične stanice do zrele crvene krvne stanice s prikazom faktora rasta koji djeluju na proces. Posebno istaknuti dio se odnosi na trenutak djelovanja EPO na razvoj eritrocita. *Izvor slike:* (33)

Od kada je otkrivena tehnika kloniranja gena i dobivanje neograničene količine eritropoetina tehnologijom rekombinantne DNA, otvorile su se mnoge mogućnosti za kliničku primjenu tog hormona. (31) Danas se rekombinantni humani eritropoetin (rhEPO) koristi pri liječenju anemije izazvane raznim bolestima, ali najviše je u primjeni kod anemije u oboljelih od kronične bolesti bubrega, anemije izazvanom kemoterapijom kod bolesnika s rakom, upalnom bolesti crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis) i mijelodisplazije od liječenja raka (kemoterapija i zračenje). Korištenje rhEPO u svrhu liječenja bi po svemu sudeći moglo biti sve češće i kod drugih bolesti, ne samo pri liječenju anemije. Do sada su provedena mnoga istraživanja prema čijim je rezultatima vidljivo kako rhEPO ima potencijal biti korišten kao neuroprotektivni lijek u ishemijskom moždanom udaru, ima učinak na liječenje ozljeda leđne moždine zbog svog protuupalnog i anti apoptotskog djelovanja pa čak se smatra da je moguće

i da ublažava depresiju i neurokognitivne deficite. Isto tako, kod već provedenog eksperimentalnog istraživanja na životinjama i ljudima s dijabetesom, utječe na sve faze zacjeljivanja rana i pokazuje vrlo dobre rezultate za kronično zacjeljivanje rana kod osoba s kroničnim dijabetičkim ranama. (32)

### 1.4.3. SIRT1

SIRT1 (engl. *silent information regulator two protein 1*) je dio Sirtuin obitelji nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>)-ovisnih deacetilaza. Sirtuin-1 (SIRT1) je najbliži homolog Sir2 (engl. *silent mating type information regulation 2*) kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*. Kod sisavaca je otkriveno sedam članova Sir2 homologa i identificirani su kao SIRT1-7. (40, 43) Oni su histonske deacetilaze (HDAC) klase III. U reakciji deacetilaze, SIRT1 prenosi acetilne ostatke od acetil-lizina iz histona do ADP-riboza skupine na NAD<sup>+</sup>, što rezultira nastankom nikotinamida, 2'-O-acetil ADP riboze i deacetiliranog proteina. SIRT1 troši jedan NAD<sup>+</sup> za prijenos jednog acetilnog ostatka i stoga aktivacija SIRT1 smanjuje omjer NAD<sup>+</sup>/NADH. Smanjeni omjer NAD<sup>+</sup>/NADH, kao i proizvodnja nikotinamida, mogu inhibirati aktivnost SIRT1, odnosno nikotinamid djeluje kao inhibitor negativne povratne sprege. (Slika 4) (38, 40)



**Slika 4.** Ilustrirani prikaz enzimske reakcije koju katalizira SIRT1. SIRT1 katalizira deacetilaciju nekoliko proteina trošenjem NAD<sup>+</sup>, stvarajući nikotinamid (NAM) i 2'-O-acetil

ADP ribozu. NAM se reciklira natrag u NAD<sup>+</sup> pomoću enzima nikotinamid fosforibosiltransferaze (NAMPT), nikotinamid mononukleotid adenililtransferaze (NMNAT) i nikotinamid mononukleotida (NMN). *Izvor slike: (41)*

SIRT1 dokazano igra važnu ulogu u raznim staničnim funkcijama. Ima biološke učinke ne samo kroz deacetilaciju histona, već i kroz deacetilaciju raznih transkriptorskih faktora koji uključuju p53, FOXO, RelA/p65, STAT3, PGC1 $\alpha$  i PPAR- $\gamma$ . (39) Regulira širok raspon funkcija, kao što su metabolizam povezan s metabolizmom lipida i glukoze, biogeneza mitohondrija, upalni procesi, autofagija kao i otpornost na stres, apoptoza te utišavanje kromosoma. (38) Primjerice, regulira aktivnost p53 deacetilacijom i potiče preživljavanje stanica supresijom p53-ovisne apoptoze kao odgovor na oštećenje DNA i oksidativni stres. Isto tako se pokazao da regulira aktivnosti FOXO (engl. *Forkhead Box O*) obitelj transkripcijskih faktora deacetilacijom i tako inhibira njihovu sposobnost izazivanja stanične smrti. (39, 42)

Kako aktivacija SIRT1 dokazano pruža zaštitu stanica od oksidativnog stresa, a on je ključni mehanizam razvitka mnogih bolesti, smatra se da igra važnu ulogu kod budućeg liječenja mnogih bolesti. Tako se smatra da ima perspektivu u terapiji liječenja dijabetesa tip II. Istraživanja su dokazala da SIRT1 moguće sudjeluje u kontroli homeostaze glukoze. Mehanizmi koji mu to omogućuju su: regulacija lučenja inzulina i zaštita beta-stanica gušterače, poboljšanje otpora prema inzulinu modulacijom postinzulinskih receptora, smanjenje upale, mobilizacija lipida i izlučivanje adiponektina, (Tablica 1) (38)

**Tablica 1.** Uloga SIRT1 na metabolizam glukoze i lipida u relaciji s dijabetesom tip II

Područje djelovanja	Uloga
Gušterača	Pojačano lučenje inzulina; Zaštita $\beta$ -stanica
Signalizacija inzulina	Pojačana osjetljivost na inzulin
Upalni proces	Pojačana osjetljivost na inzulin
Masno tkivo	Pojačana mobilizacija lipida i izlučivanje adiponektina
Skeletni mišić	Pojačana biogeneza mitohondrija i unos glukoze

Mitochondrij	Pojačana biogeneza i oksidacija masnih kiselina; Smanjen nastanak ROS
Jetra	Metabolizam glukoze i lipida; Nastanak glukoze i pojačana oksidacija masnih kiselina

Skraćenice: ROS, reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

#### 1.4.4. BDNF

BDNF, moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), je član obitelji neurotrofina, proteina koji potiču preživljavanje, razvoj i funkciju neurona. U obitelji neurotrofina, osim BDNF-a, ulaze i faktor rasta neurona (NGF, engl. *nerve growth factor*), neurotrofin-3 (NT-3) i neurotrofin-4 (NT-4). Visoke razine BDNF-a su detektirane u hipokampusu, amigdali, malom mozgu i kori velikog mozga kod glodavaca i ljudi, s najvišom razinom u neuronima hipokampusa. Nešto manje razine ove molekule su otkrivene u drugim organima poput jetre, srca i pluća. (47) Kao i ostali neurotrofini, BDNF se u početku sintetizira kao prekursor (proBDNF), koji se može pohraniti u dendrite ili aksone, te se zatim podvrgava unutarstaničnom ili izvanstaničnom cijepanju za proizvodnju zrelog mBDNF. (44, 47) Utvrđeno je da proBDNF i mBDNF izazivaju suprotne funkcije u neuronima aktivacijom različitih receptora. Prekursor, proBDNF, reagira s pan-neurotrofin receptorom p75 (p75NTR) dok se mBDNF selektivno veže i aktivira tirozin kinaza B receptor (TrkB). (44, 46) Mnoge studije tijekom posljednjih nekoliko desetljeća su dokazale da je zreli BDNF (mBDNF, engl. *mature BDNF*) ključni faktor za diferencijaciju neurona, strukturu neurona kao i funkciju neurona, odnosno razvoja sinapsi (45, 46). Razlog tome je to što je BDNF jedini neurotrofin koji se izlučuje ovisno o aktivnosti, a zbog toga je i najvažniji kod pamćenja ovisnom o hipokampusu u ljudskom mozgu. (44)

Kako je BDNF neophodan za proliferaciju i diferencijaciju neurona te ima vitalnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti zbog čega pojačava dugoročno potenciranje i promiče učenje i pamćenje, potencijalni je neuroprotektivni lijek. Primjerice, prema nekim istraživanjima bi BDNF mogao biti posrednik u mehanizmu djelovanja neuro steroida dihidroepiandrosterona (DHEA) i njegovog sulfata (DHEAS) u liječenju Alzheimerove bolesti. (48, 49)



### 1.1.5. I $\kappa$ B $\alpha$

Nuklearni faktor-kapa B (NF- $\kappa$ B) nije pojedinačni protein nego je to mala obitelji transkripcijskih faktora koja djeluje u gotovo svim stanicama sisavaca. Signalni put NF- $\kappa$ B jedan je od najbolje shvaćenih imunoloških puteva zahvaljujući gotovo četiri desetljeća intenzivnog istraživanja. Definiran je interakcijama između NF $\kappa$ B dimera, I $\kappa$ B regulatora i IKK kompleksa. (51) NF- $\kappa$ B signalizacija se aktivira brojnim diskretnim podražajima i prilikom povezivanja liganda i receptora pokreće razne stanične ishode koji su primjereni specifičnom primljenom signalu. Glavni je regulator imunološkog razvoja, imunoloških odgovora, upalnih odgovora na patogene i stanice raka, kao i ključni regulator autoimunih bolesti. (50, 51) Signalni modul NF- $\kappa$ B sastoji se od pet monomera NF- $\kappa$ B (RelA/p65, RelB, cRel, NF- $\kappa$ B1 p50 i NF- $\kappa$ B2 p52) koji mogu dimerizirati kako bi stvorili do 15 jedinstvenih transkripcijskih faktora. I $\kappa$ B $\alpha$  je dio I $\kappa$ B obitelji inhibitornih proteina zajedno sa I $\kappa$ B $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , i  $\delta$ . Podgrupe proteina NF- $\kappa$ B i I $\kappa$ B su izraženi u svim vrstama stanica sisavaca, uključujući eritrocite. (51, 52)

Među ciljnim genima koji  $\kappa$ B reguliraju su I $\kappa$ B-ovi koji su, nakon transkripcijske indukcije i resinteze, u mogućnosti translocirati se u jezgru, vezati i inhibirati aktivnost NF $\kappa$ B-a, vraćajući ga u citosol (citoplazmatski matriks), što ih čini primarnom komponentom samo regulirajuće povratne sprege. Najbolje proučen I $\kappa$ B je I $\kappa$ B $\alpha$ . Kada se NF- $\kappa$ B nalazi u citoplazmi stanice, vezan je za inhibicijski I $\kappa$ B $\alpha$  protein. Kada se IKK (I $\kappa$ B kinaza) aktivira raznim signalima, dolazi do fosforilacije i degradacije I $\kappa$ B $\alpha$  proteina što dovodi do oslobađanja NF- $\kappa$ B proteina koji zatim ulazi u jezgu i posljedično djeluje na ekspresiju mnogih gena, uključujući gene koji prepisuju citkone, proteine koji potiču smrt stanice ili preživljavanje stanica i sl. (56)

Smatra se da postoji neiskorišteni potencijal za točnije terapijsko ciljanje signalnog sustava NF- $\kappa$ B koje zahtjeva kvantitativno razumijevanje dinamičke kontrole i integraciju raznih fizioloških i patoloških podražaja. (51)

## 2. Cilj istraživanja

Obzirom na ograničene terapijske mogućnosti liječenja osoba oboljelih od dijabetesa, a sve veći porast incidencije bolesti kod ljudi u zadnjih nekoliko godina, velika pažnja se pridaje intenzivnim istraživanjima usmjerenim na bolje razumijevanje etiopatogeneze ove bolesti kao i pronalazak novih, pristupačnijih i učinkovitijih terapijskih opcija.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. ispitati potencijalne neuroprotektivne učinke rhEpo u korteksu i hipokampusu štakora s eksperimentalnim dijabetesom izazvanim streptozotocinom (STZ)
2. istražiti moguće mehanizme neuroprotektivnog djelovanja rhEpo praćenjem ekspresije i aktivnosti SIRT 1 proteina kao i markera oksidativnog stresa, odnosno proBDNF i mBDNF proteina te I $\kappa$ B $\alpha$  u gore navedenim moždanim strukturama.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1 Eksperimentalne životinje

Eksperimentalni pokusi su provedeni na odraslim mužjacima štakora soja Hannover-Wistar (HW), tjelesne mase 250 - 350 g. Jedinke su čuvane u nastambi za pokusne životinje Zavoda za farmakologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci, u kontroliranim uvjetima s pravilnim izmjenjivanjem razdoblja 12-satne svjetlosti i tame, uz stalnu sobnu temperaturu između 22°C i 24°C i vlagu 55%  $\pm$  10% gdje im je omogućen pristup standardnoj hrani za štakore i vodi. Svi provedeni eksperimentalni postupci na životinjama odobreni su od strane Etičkog povjerenstva fakulteta te su postupci provedeni u skladu s hrvatskim zakonima i pravilima (NN 135/06; NN 37/13; 55/13) i smjernicama utvrđenima Direktivom Vijeća Europske zajednice (2010/63 / EU). Ispitivanja su bila provedena u skladu s osnovama tzv. 3R pristupa - *Replacement* = nadomještanje životinja, *Reduction* = smanjenje broja životinja, *Refinement* = oplemenjivanje postupaka prema životinjama, u svrhu umanjenja patnje i broja životinja podvrgnutih eksperimentu.

#### 3.2 Eksperimentalni model dijabetesa

Diabetes mellitus izazvan je intraperitonealnom (i.p.) primjenom pojedinačne injekcije streptozotocina (STZ) (65 mg/kg tjelesne težine) mužjacima štakora Hannover-Wistar (150 mg). Životinje su podijeljene u nekoliko eksperimentalnih skupina koje se sastoje od četiri životinja nasumično raspoređenih u svaku skupinu. Kontrolnu skupinu sačinjavale su zdrave, netretirane životinje. Pet tjedana nakon injekcije STZ-a, dio životinja koje su razvile dijabetes primile su rhEPO (40  $\mu$ g/kg tjelesne težine) (Diab/EPO) ili otapalo (Diab), četiri dana uzastopno, te su idući dan žrtvovane. Pratili smo razine SIRT1, proBDNF, mBDNF i IkB $\alpha$ . Statistička analiza provedena je parametrijskim postupcima statističke raščlambe, jednosmjernom (*one-way*) analiza varijance (ANOVA) s Duncan Multiple Range post-hoc testom. Statistički značajnom razlikom smatrana je Razina od  $p < 0,05$ . Postupci statističke raščlambe su učinjeni pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

### 3.3 Priprema tkiva

Uzorci parijetalnog korteksa i hipokampusa štakora s eksperimentalnim dijabetesom su ultrazvučno homogenizirani u puferu za lizu, i to uzorci parijetalnog korteksa u 500  $\mu\text{L}$ , a uzorci hipokampusa u 1200  $\mu\text{L}$  pufera za lizu. Sljedeći korak je bilo centrifugiranje s hlađenjem +4 °C gdje su se uzorci centrifugirali deset minuta na 11600 okretaja u minuti (RPM; engl. *rounds per minute*). U zadnjem koraku pripreme je odmjereno 40  $\mu\text{L}$  alikvota supernatanta svakog uzorka i spremljeno u hladnjak na temperaturu od -80 °C.

### 3.4 Imunoprecipitacija

Pri postupku imunoprecipitacije korištene su SureBeads magnetne kuglice na koje je bilo vezano primarno protutijelo FOXO1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD) (1:2000) u količini 4  $\mu\text{L}$  po uzorku s ciljem izdvajanja proteina od interesa. Nakon učinjene magnetizacije, odstranjen je supernatant, a preostale kuglice su isprane puferiranom fiziološkom otopinom (engl. Phosphate Buffered Saline) s dodatkom 0,1% Tween-20 (T). Nakon što je potom u kuglice dodan lizat s antigenom, uzorci su se rotirali jedan sat na sobnoj temperaturi. Po završetku rotacije, kuglice su ponovno magnetizirane i još jednom je odstranjen supernatant, a preostale kuglice su isprane s PBS-T. Zatim je dodano 40  $\mu\text{L}$  2x Laemmli pufera i inkubirano 10 min na 70 °C. U posljednjem koraku imunoprecipitacije se kuglice i treći puta magnetiziraju, a supernatant se odvaja i uzima za daljnju analizu pomoću western blot metode.

### 3.5. Western blot analiza

Western blot analiza je korištena za mjerenje ekspresije proteina od interesa u uzorcima hipokampusa i korteksa. Uzorci su najprije stavljeni na SDS-PAGE gel nakon čega je provedena elektroforeza u trajanju od 40 minuta na 200 V u sustavu Mini-PROTEAN® Tetra (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD). Po završetku elektroforeze su uzorci transferirani na nitroceluloznu membranu u sustavu za prijenos Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD). Nakon toga, membrane su inkubirane 1 sat s 5% mlijeka ili 5% goveđeg serumskog albumina (engl. bovine serum albumine, BSA) u TBS-T. Membrane su ostavljene na inkubaciju preko noći s primarnim protutijelima pri 4 °C. Korištena primarna protutijela navedena su u Tablici 1.

**Tablica 2.** Popis protutijela korištenih za western blot analizu

<b>Primarno protutijelo</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač (referentni broj)</b>
<b>Zečje poliklonalno anti-SIRT1</b>	1:500 (WB)	Abcam Ltd., Cambridge, UK (ab75435)
<b>Mišje monoklonalno anti-FOXO1 (D8T1S)</b>	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD (#97635S)
<b>Zečje monoklonalno anti-acetil lizin [RM101]</b>	1:2000 (WB)	Abcam Ltd., Cambridge, UK (ab190479)
<b>Zečje poliklonalno anti-BDNF</b>	1:500 (WB)	Abcam Ltd., Cambridge, UK (ab6201)
<b>Mišje monoklonalno anti-<math>\beta</math>-aktin (C4)</b>	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California (sc-47778)
<b>Mišje monoklonalno anti-HSP 70 (W27)</b>	1:200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California (sc-24)
<b>Mišje monoklonalno anti-IkB<math>\alpha</math> (H-4)</b>	1:200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California (sc-1643)

Idući su dan membrane inkubirane odgovarajućim sekundarnim protutijelima u trajanju 1 sat. Sekundarna antitijela koja su korištena su: anti zečje (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, SAD) i anti mišje (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, SAD), a oba su konjugirana s biotinom. Nakon inkubacije, membrane su ponovno isprane TBST-om, a nakon toga inkubirane s Streptavidin konjugatom hrenove peroksidaze 30 minuta. Nakon dodavanja kemiluminiscentnog supstrata SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, USA) vizualizacija je izvedena pomoću Kodak Image Station 440, a izražaj proteina je analiziran u programu Kodak 1D (v.3.6.5, Kodak Scientific Imaging Systems, SAD).

### 3.6. Kvantifikacija proteina

Koncentracije proteina u uzorcima određivane su metodom po Bradfordu (1976.), koristeći pročišćeni BSA kao standard.

### 3.7. Prikupljanje i obrada podataka

Microsoft Office Excell® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD) je korišten za pohranu podataka kao i za izradu grafičkih prikaza. Za analizu mikrofotografija korišten je ImageJ program (NIH, Bethesda, MD, SAD). Vrijednosti koje su dobivene izražene su kao mjera središnjice i raspršenja. Za statističku analizu podataka korišteni su parametrijski postupci statističke raščlambe, jednosmjerna (*one-way*) analiza varijance (ANOVA) s Duncan Multiple Range post-hoc testom. Statistički značajnom razlikom smatrana je Razina od  $p < 0,05$ . Postupci statističke raščlambe su učinjeni pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

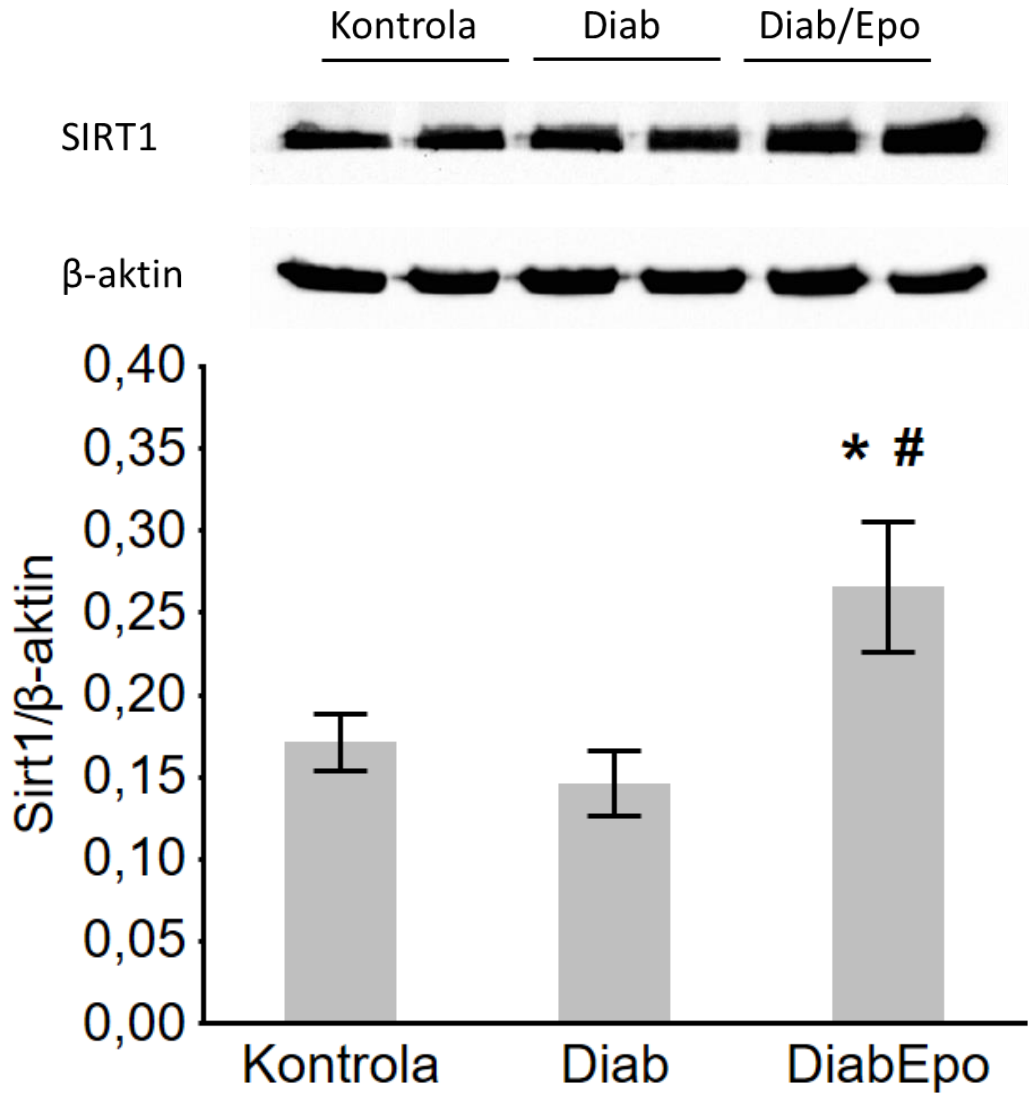
## **4. Rezultati**

### **4.1. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora s eksperimentalnim dijabetesom**

Prema opisanom eksperimentalnom modelu dijabetesa promatrana je razina ekspresije i aktivnosti SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu eksperimentalnih štakora. Iz rezultata prikazanih na Slici 5.A vidljivo je da postoji statistički značajna razlika [(F2;9) = 5,279; p = 0,0304] u vrijednosti ekspresije SIRT1 proteina u diabetičkih štakora tretiranih s rhEpo (Diab/Epo) u usporedbi s vrijednostima u životinja kontrolne skupine (Kontrola) i skupine diabetičkih štakora tretiranih otapalom (Diab).

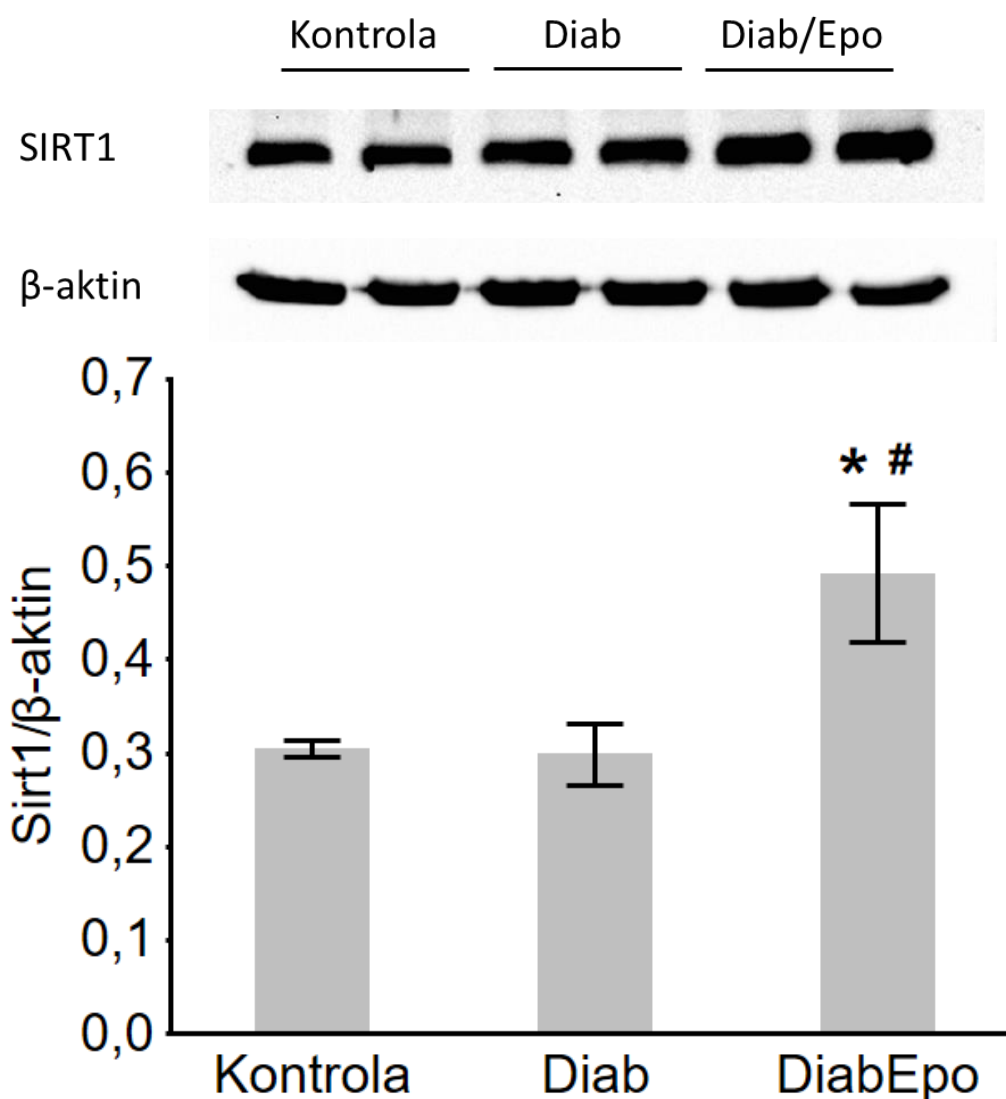
Ispitivanja u hipokampusu eksperimentalnih štakora su također pokazala statistički značajnu razliku [(F2;9) = 5,4799; p = 0,0278] u razini ekspresije SIRT1 proteina kod životinja tretiranih s rhEPO u usporedbi s kontrolnom skupinom, kao i sa skupinom kod životinja tretiranih s otapalom (Diab). Kao što se može vidjeti i na Slici 5.B, ponovno je ekspresija vidno izraženija u skupine životinja tretiranih s rhEPO.

A.





B.

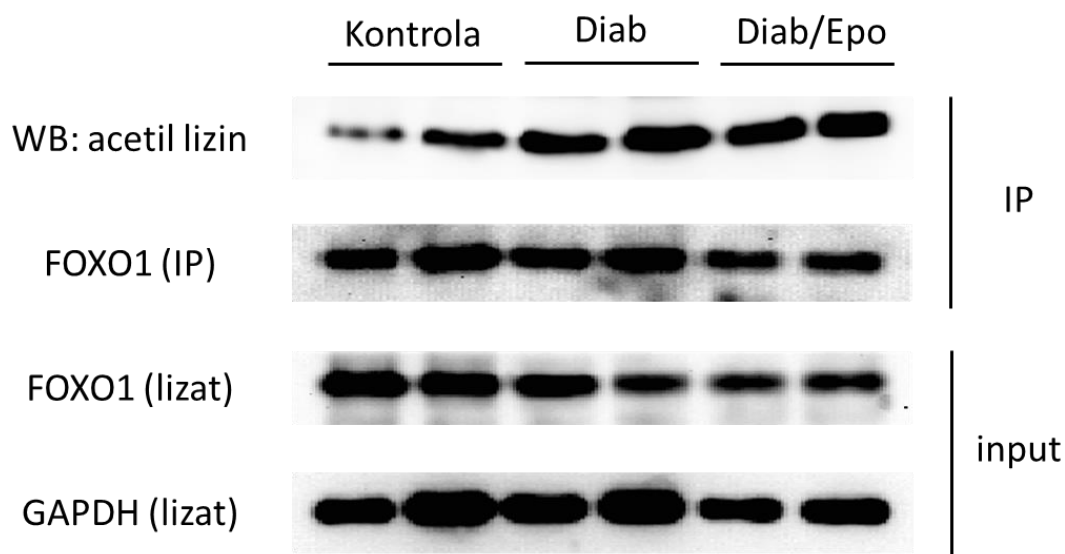


**Slika 5.** Učinak rhEPO na ekspresiju SIRT1 u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora 24 sata nakon posljednje injekcije rhEPO i otapala (Diab). Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize SIRT1, korigirane za vrijednost  $\beta$ -aktina. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM (n=3-4). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), štakori tretirani otapalom (Diab) i štakori tretirani s rhEPO (Diab/EPO).

\*p<0,05 različito od Kontrole; #p<0,05 različito od otapala (Diab)

Praćenje aktivnosti SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu (Slika 6.) pokazalo je da došlo do statistički značajne promjene razine aktivnosti SIRT1 proteina kod životinja s izazvanim dijabetesom i tretiranih s rhEPO. Naime, pratili smo deacetilira li SIRT1 FOXO1.

Stanični ekstrakti imunoprecipitirani su antitijelom protiv FOXO1 i imunoblotirani antitijelima na acetil-lizin. Primjena rhEpo povećala je količinu acetiliranog FOXO1 u stanicama korteksa.



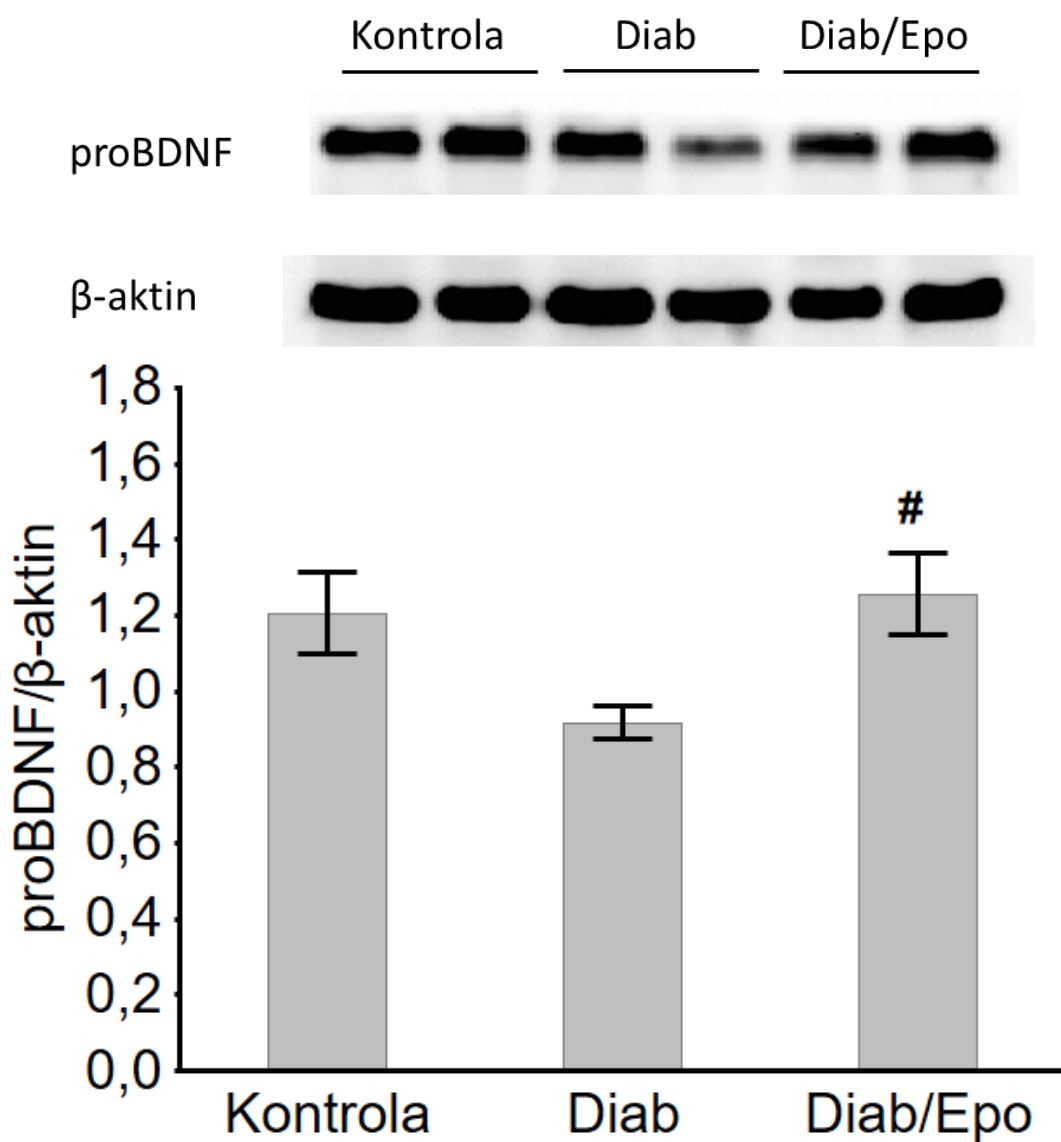
**Slika 6.** Učinak rhEPO na aktivnost SIRT1 u parijetalnom korteksu štakora 24 sata nakon posljednje injekcije rhEPO i otapala. FOXO1 je imunoprecipitiran (IP) iz lizata cijelih stanica. Proteini su eluirani s magnetnih kuglica obilježenih anti-FOXO1 protutijelom, a razina acetilacije FOXO1 analizirana je western blot (WB) analizom pomoću protutijela protiv acetiliranog lizina (Ac-Lys). Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina (n=3-4). Kontrolna skupina štakora (Kontrola), štakori tretirani otapalom (Diab) ili s rhEPO (Diab/EPO).

#### 4.2. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost proBDNF i mBDNF proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom

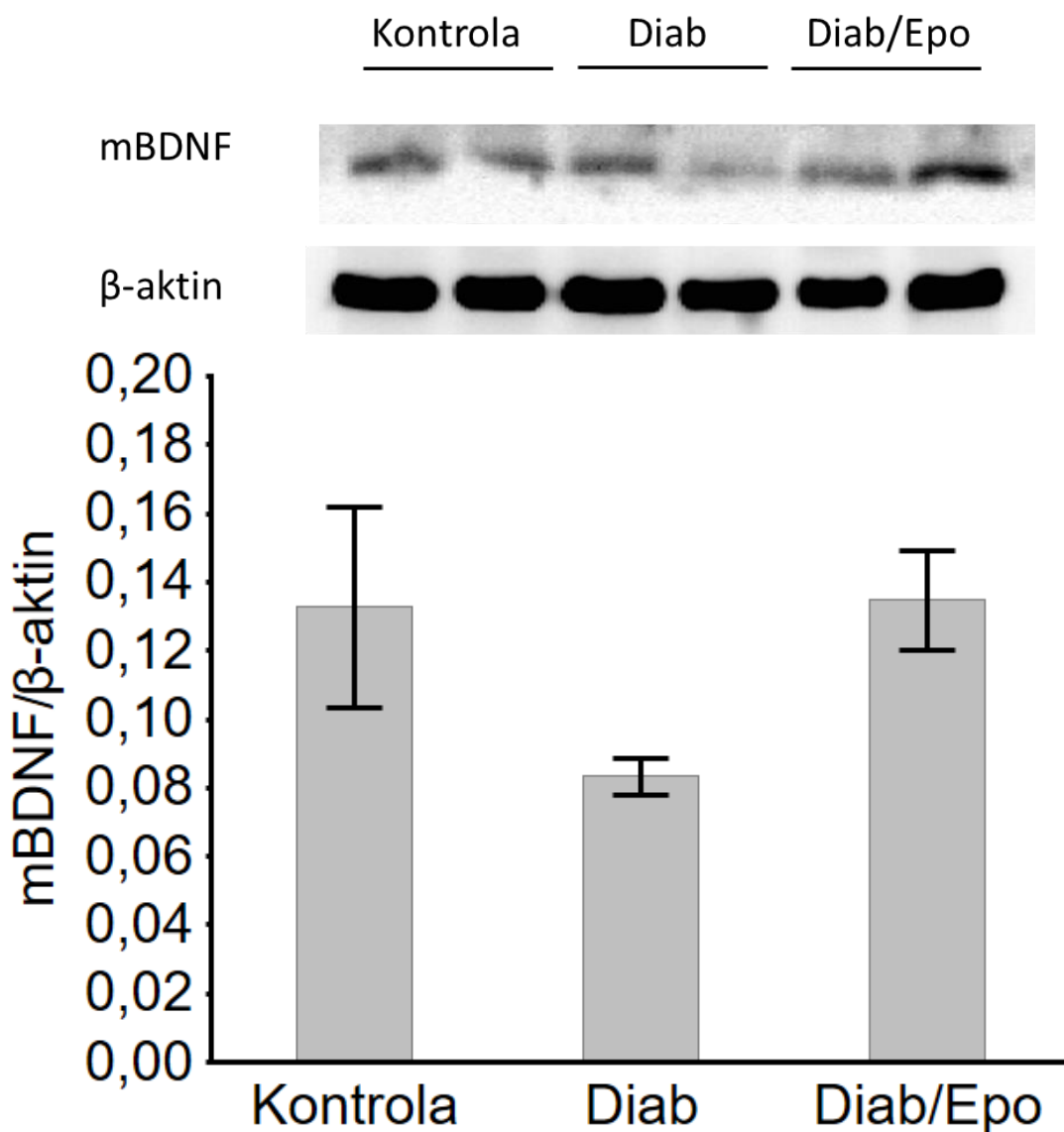
U uzorcima parijetalnog korteksa eksperimentalnih štakora se istraživala ekspresija i aktivnost proBDNF i mBDNF proteina kod kontrolne skupine štakora, štakora tretiranih s otapalom (Diab) i štakora tretiranih s rhEPO. Rezultati ekspresije proBDNF pokazuju statistički značajnu razliku [(F2;8) = 4,5649; p = 0,0476] kod životinja tretiranih s rhEPO u usporedbi sa životinjama tretiranim s otapalom (Diab), ali ne i u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja, što je vidljivo i na Slici 7. A.

Iz rezultata prikazanih na Slici 7. B evidentno je da ANOVA analiza nije pokazala statistički značajan utjecaj rhEPO na ekspresiju mBDNF proteina u parijetalnom korteksu eksperimentalnih životinja kojima je izazvan dijabetes [(F2;8) = 3,2508; p = 0,0926].

A.



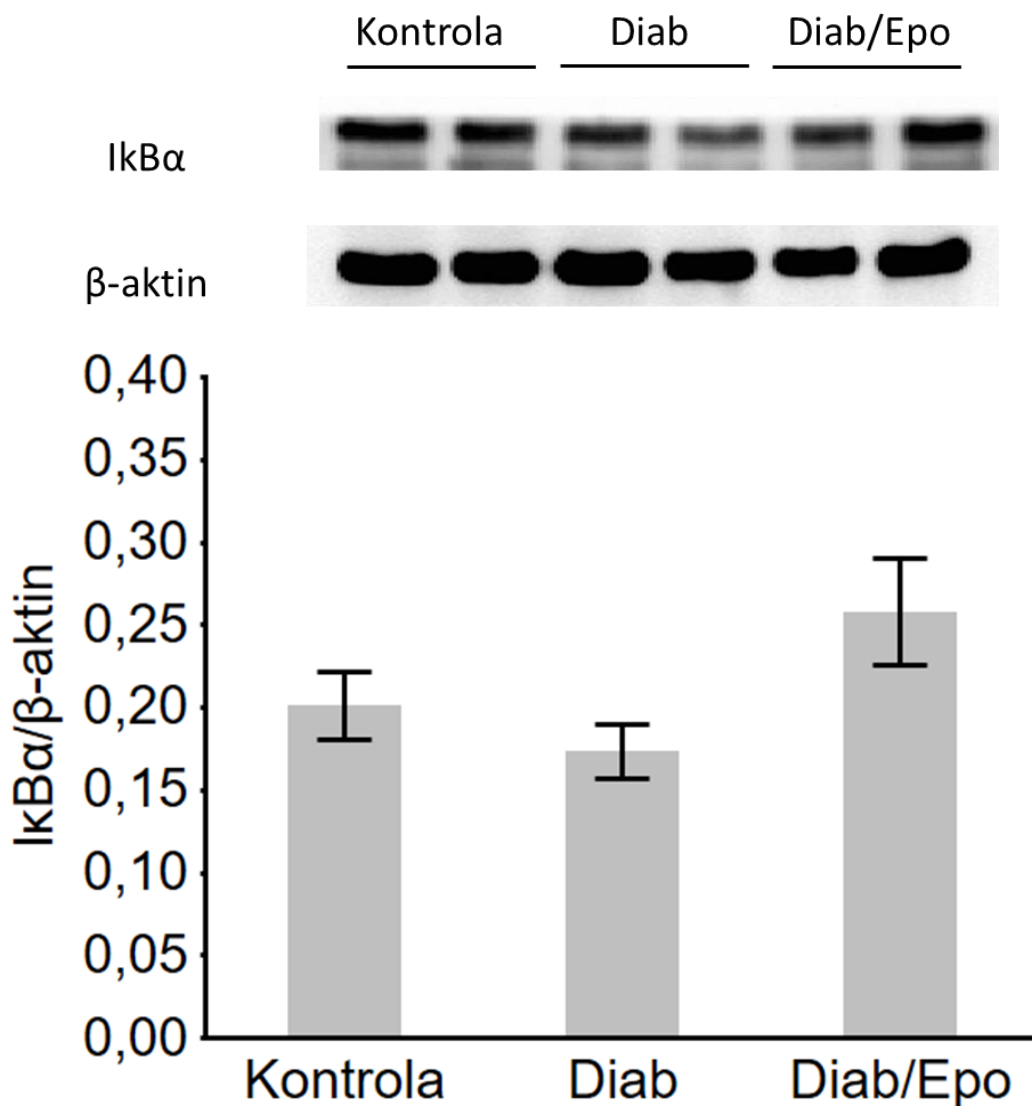
B.



**Slika 7.** Učinak rhEPO na ekspresiju proBDNF (A) i mBDNF (B) u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom 24 sata nakon posljednje injekcije rhEPO i otapala. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuće denzitometrijske analize proBDNF i mBDNF, korigirane za vrijednosti  $\beta$ -aktina. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM ( $n=3-4$ ). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), štakori tretirani otapalom (Diab) i štakori tretirani s rhEPO (Diab/EPO).

### 4.3. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost I $\kappa$ B $\alpha$ proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom

Istraživan je učinak rhEPO na ekspresiju i aktivnost I $\kappa$ B $\alpha$  proteina u parijetalnom korteksu kontrolne skupine, skupine diabetičkih štakora tretiranih otapalom (Diab) i skupine diabetičkih štakora tretiranih s rhEPO. Premda ekspresija I $\kappa$ B $\alpha$  raste kod životinja tretiranih s rhEPO, prema dobivenim rezultatima nije zabilježena statistička značajna razlika u ekspresiji I $\kappa$ B $\alpha$  u usporedbi s promatranim skupinama [(F2;8) = 3,2587; p = 0,0922] (Slika 8).



**Slika 8.** Učinak rhEPO na ekspresiju I $\kappa$ B $\alpha$  proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom 24 sata nakon posljednje injekcije rhEPO ili otapala. Prikazani su reprezentativni uzorci blotova štakora eksperimentalnih skupina i pripadajuća

denzitometrijska analiza izražaja I $\kappa$ B $\alpha$ , korigirana za vrijednosti  $\beta$ -aktina. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM (n=3-4). Životinje kontrolne skupine (Kontrola), štakori tretirani otapalom (Diab) i štakori tretirani s rhEPO (Diab/EPO).

## 5. Rasprava

### 5.1. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost SIRT1 proteina u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora s eksperimentalnim dijabetesom

Prema Maiese K., u eksperimentalnim modelima dijabetesa, rhEPO može smanjiti udio glukoze u krvi, štititi od negativnih učinaka pretilosti i tretirati perifernu neuropatiju u animalnim modelima dijabetesa. Pokazalo se i da protuupalnim mehanizmima i blokadom apoptoze, rhEPO može zaštititi beta-stanice gušterače u modelima dijabetesa tip I i dijabetesa tip II. Navodi da rhEPO djelujući na FoxO i SIRT1 proteine može zaštititi stanice od apoptozne vaskularne ozljede, održavati homeostazu energije masnih stanica i modulirati tijekom autofagije radi poboljšanja funkcije srca. EPO ovisi o aktivnosti SIRT1 za sprječavanje staničnih ozljeda tijekom oksidacijskog stresa i povišene razine glukoze. EPO može pojačati staničnu aktivnost SIRT1 i promicati podstanično kretanje SIRT1 u jezgru zbog zaštite endotelnih stanica tijekom oksidativnog stresa. (53)

Prema autoru Chong ZZ. i sur., u stanicama rezistentnim na inzulin je protein SIRT1 značajno smanjen te smanjena razina SIRT1 u trbušastom mišiću lista (lat. *musculus gastrocnemius*) kod miševa dovodi do smanjene tolerancije na glukozu. Isto tako inhibicija SIRT1 narušava signalizaciju inzulina ometajući fosforilaciju inzulinski stimuliranih receptora inzulina i glikogen sintazu. Također je zabilježeno kod eksperimentalnih miševa kako SIRT1 kontrolira osjetljivost na inzulin preko tirozin fosfat proteina (PTP). Inhibicijom navedenog proteina SIRT1 povećava se osjetljivost stanica na inzulin i glikemijsku kontrolu. Kao i prethodno spomenuti autor, i u ovom radu je zaključeno kako osim regulacije inzulinske osjetljivosti može imati utjecaj na metabolizam masti i na pretilost. (54)

U ovom radu je dokazano da u parijetalnom korteksu, kao i hipokampusu, eksperimentalnih životinja s dijabetesom tretiranih s rhEpo postoji statistički značajan porast razine ekspresije SIRT1 proteina. Dobiveni rezultati upućuju na potencijalno neuroprotektivno djelovanje lijeka upravo putem modulacije razine ekspresije i aktivnosti SIRT1 proteina. Prema tome, kao i za mnoge druge bolesti (neurodegenerativne bolesti, tumorigeneza, kardiovaskularne bolesti, metaboličke bolesti...) modulacija SIRT1 puta predstavlja potencijal u daljnjim istraživanjima potencijalnog neuroprotektivnog učinka u dijabetesu.

## **5.2. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost proBDNF i mBDNF proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom**

U ovom radu je istraživana utjecaj rhEPO na prekursor BDNF-a (proBDNF) kao i na zreli BDNF (mBDNF). Kako ova dva proteina imaju nešto različito djelovanje, tako su pokazali i rezultati. Proučavana je ekspresija i aktivnost oba gena u parijetalnom korteksu eksperimentalnih štakora. Kod ekspresije i aktivnosti proBDNF je zabilježen statistički značajan porast u skupini eksperimentalnih životinja koje su tretirane s rhEPO. Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji mBDNF između promatranih skupina.

Prema istraživanju Mohamed N.A. i sur., koji su proćavali utjecaj BDNF-a na mozgove štakora iz četiri različite skupine (Kontrola, otapalo (Diab), Diab/EPO, EPO), prikazana je smanjena ekspresija ovog neurotropina u regijama mozga kod štakora s eksperimentalnim dijabetesom. (55)

U istraživanju utjecaja Yang Y. i Gao L. drugog potencijalnog neuroprotektivnog lijeka, celekoksiba, na ekspresiju i aktivost BDNF-a u mozgu štakora s eksperimentalnim dijabetesom. Izmjerali su razinu proteina BDNF i TrkB u hipokampusu štakora te su otkrili da je BDNF razina u hipokampalnom homogenatu bila je značajno snižena u skupini modela za dijabetes. Lijećenje celekoksibom pojaćano regulira BDNF i TrkB fosforilacija u usporedbi s dijabetičkom skupinom. Osim toga, razine BDNF u serumu smanjile su se kod životinja s dijabetesom u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok je celekoksib ublažio smanjenje. (57) Zaključno tome, iako su potrebni daljnji istraživaćki napori kako bi se razjasnilo temeljni događaji stanićne i molekularne signalizacije, celekoksib je ublažio memorijske poremećaje u štakora s dijabetesom ciljajući putove (BDNF-TrkB), što predstavlja obećavajuće mogućnosti lijećenja memorijskih deficita povezanih s dijabetesom kod ljudi. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima istraživanja kojeg su proveli Wu W., Wang X. i sur. Oni nisu proćavali model štakora s dijabetesom, već utjecaj na starenje mozga štakora koristeći Astaksantin koji utjeće na razinu BDNF-a. U hipokampusu njihove kontrolne skupine štakora izražena je visoka razina BDNF-a, dok je u skupini štakora s izazvanim D-galaktoza (D-G)-induciranim staranjem mozga vidno došlo do smanjenja ekspresije BDNF-a. U mozgu skupine štakora koji su tretirani lijekom, razina BDNF-a se povećala, odnosno vratila na razinu približnu onoj kod kontrolne skupine. (58)



### **5.3. Utjecaj rhEPO na ekspresiju i aktivnost I $\kappa$ B $\alpha$ proteina u parijetalnom korteksu štakora s eksperimentalnim dijabetesom**

U ovom radu je istraženo kako rhEPO utječe na ekspresiju I $\kappa$ B $\alpha$  u parijetalnom korteksu eksperimentalnih štakora. Veća razina ekspresije I $\kappa$ B $\alpha$  je zabilježena kod skupine štakora koji su bili tretirani s rhEPO, ali analizom podataka nije zabilježena statistički značajna razlika između te skupine štakora i kontrolne skupine kao niti skupine štakora tretiranih otapalom (Diab). Kako je I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor N $\kappa$ FB proteina, dobiveni rezultati su obećavajući, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dokazao učinak rhEPO na povećanje ekspresije I $\kappa$ B $\alpha$  proteina.

## 6. Zaključak

U ovom istraživanju smo dobili rezultate koji pokazuju:

1. Primjena rekombinantnog humanog eritropoetina (rhEPO) izazvala je statistički značajan porast ekspresije SIRT1 proteina u mozgovima štakora s eksperimentalnim dijabetesom i to u parijetalnom korteksu mozga isto kao i u hipokampusu, u usporedbi sa kontrolnom skupinom štakora i skupinom štakora tretiranih s otapalom (Diab).
2. Zabilježena je statistički značajna razlika u ekspresiji proBDNF proteina u parijetalnom korteksu štakora tretiranih s rhEPO i onih tretiranih s otapalom (Diab). Nije zabilježena statistički značajna promjena razine ekspresije mBDNF u ispitivanoj regiji mozga eksperimentalnih životinja.
3. U parijetalnom korteksu životinja je zabilježeno povećanje razine I $\kappa$ B $\alpha$  proteina uslijed primjene rhEPO, no dobiveni podaci nisu statistički značajni.

Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da je modulacija SIRT1 proteina jedan od mogućih mehanizama potencijalnog neuroprotektivnog djelovanja rhEpo.

## 7. Literatura

1. Jurišić-Eržen D, Benko K, Starčević-Klasan G, Jerković R. Kortikosteroidi i šećerna bolest: nove spoznaje i perspektive u liječenju. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2016 [pristupljeno 26.07.2021.];52(2):185-189. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/158502>
2. (2017). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes:Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care*, 41(Supplement 1), S13–S27. doi:10.2337/dc18-s002
3. Puljić D. *Diabetes mellitus* [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2015 [pristupljeno 23.07.2021.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:528587>
4. Emerging Risk Factors Collaboration et al. “Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies.” *Lancet* (London, England) vol. 375,9733 (2010): 2215-22. doi:10.1016/S0140-6736(10)60484-9
5. Batičić L, Ivanović L, Grčić A, Pernjak Pugel E, Varljen J, Detel D. Šećerna bolest i inhibitori DPP IV/CD26. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2019 [pristupljeno 23.07.2021.];55(3):200-214. [https://doi.org/10.21860/medflum2019\\_221600](https://doi.org/10.21860/medflum2019_221600)
6. Petričić A., Vulić-Prtorić A. Neki prediktori suočavanja s dijabetesom tipa 1 i tipa 2. *Društvena istraživanja* [Internet]. 2009 [pristupljeno 28.07.2021.];18(1-2 (99-100)):47-65. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/37044>
7. Severinski S, Butorac Ahel I, Božinović I. Tip 1 šećerna bolest u dječjoj dobi. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2016 [pristupljeno 29.07.2021.];52.(4.):467-476. [https://doi.org/10.21860/medflum2016\\_4s](https://doi.org/10.21860/medflum2016_4s)
8. Atkinson, Mark A et al. “Type 1 diabetes.” *Lancet* (London, England) vol. 383,9911 (2014): 69-82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7
9. Hall, John E. (John Edward), 1946-, author. *Guyton and Hall textbook of medical physiology* / John E. Hall.—Thirteenth edition.p. Textbook of medical physiology. Includes bibliographical references and index.ISBN 978-1-4557-7005-2 (hardcover : alk. paper) I. Title. II. Title: Textbook of medical physiology. [DNLM: 1. Physiological Phenomena. QT 104] QP34.5 612—dc23
10. Maahs, David M et al. “Epidemiology of type 1 diabetes.” *Endocrinology and metabolism clinics of North America* vol. 39,3 (2010): 481-97. doi:10.1016/j.ecl.2010.05.011

11. Bašić-Kes V, Zavoreo I, Rotim K, Bornstein N, Rundek T, Demarin V. Recommendations for Diabetic Polyneuropathy Treatment. *Acta clinica Croatica* [Internet]. 2011 [pristupljeno 23.07.2021.];50(2):289-302. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/79504>
12. Piljac A, Metelko Ž. Inzulinska terapija u liječenju šećerne bolesti. *Medix* [Internet]. 2009 [pristupljeno 29.07.2021.];15(80/81):116-121. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/68804>
13. Hraste M, Papić G, Alajbeg A. Dijabetes i tjelovježba. *ERS* [Internet]. 2020 [pristupljeno 23.07.2021.];(42):43-46. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/245249>
14. Mayfield, J. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria." *American family physician* vol. 58,6 (1998): 1355-62, 1369-70.
15. Chatterjee, Sudesna et al. "Type 2 diabetes." *Lancet* (London, England) vol. 389,10085 (2017): 2239-2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2
16. Kokić S. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix* [Internet]. 2009 [pristupljeno 01.08.2021.];15(80/81):90-98. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/68677>
17. Fletcher, Barbara et al. "Risk factors for type 2 diabetes mellitus." *The Journal of cardiovascular nursing* vol. 16,2 (2002): 17-23. doi:10.1097/00005082-200201000-00003
18. Pfeiffer, Andreas F H, and Harald H Klein. "The treatment of type 2 diabetes." *Deutsches Arzteblatt international* vol. 111,5 (2014): 69-81; quiz 82. doi:10.3238/arztebl.2014.0069
19. Đelmiš J, Ivanišević M, Juras J, Herman M. Dijagnoza hiperglikemije u trudnoći. *Gynaecologia et perinatologia* [Internet]. 2010 [pristupljeno 02.08.2021.];19(2):86-89. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/68422>
20. Hlača N, Klobučar Majanović S. Novosti u liječenju gestacijskog dijabetesa. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2019 [pristupljeno 02.08.2021.];55(4):330-336. [https://doi.org/10.21860/medflum2019\\_227123](https://doi.org/10.21860/medflum2019_227123)
21. Kühl, C. "Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management." *Diabetes* vol. 40 Suppl 2 (1991): 18-24. doi:10.2337/diab.40.2.s18
22. IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019 [Internet]. 2019 [pristupljeno 02.08.2021]. Dostupno na: <https://diabetesatlas.org/en/>
23. Poljičanin T., Švajda M. NACIONALNI REGISTAR OSOBA SA ŠEĆERNOM BOLEŠĆU CRODIAB National Diabetes Registry CroDiab. [Internet] 2020.

- [pristupljeno 02.08.2021]. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/>
24. WHO Classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
  25. Stipančić G, Požgaj Šepec M, La Grasta Sabolić L. Prolazni neonatalni dijabetes uzrokovan novom aktivirajućom mutacijom KCNJ11-gena i uspješno prevođenje na terapiju sulfonilurejom. Liječnički vjesnik [Internet]. 2017 [pristupljeno 06.08.2021.];139(7-8):0-0. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/189783>
  26. Derežić I. Inducirani animalni modeli u fiziologiji i imunologiji [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2015 [pristupljeno 03.08.2021.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:407215>
  27. Pantić J, Volarević V, Đukić A. Eksperimentalni modeli dijabetes melitusa. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2011;12(1):29-35.
  28. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med. 2005 Apr;22(4):359-70. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x. PMID: 15787657.
  29. Nijholt K., Meems L., Ruifrok W-P. et al. The erythropoietin receptor expressed in skeletal muscle is essential for mitochondrial biogenesis and physiological exercise. (2021). Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 473. 10.1007/s00424-021-02577-4.
  30. Marti, H.H. (2008). Brain Protection by Erythropoietin : A Manifold Task Tamer Rabie. PHYSIOLOGY 23: 263–274, 2008; doi:10.1152/physiol.00016.2008
  31. Zaputović S, Krajina R, Samardžija R, Prpić I. Anemija u nedonoščadi :značenje humanoga rekombinantnog eritropoetina. Medicina [Internet]. 2003. [pristupljeno 12.08.2021.];39(1):42-45. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:764571>
  32. Hwang CH. Targeted Delivery of Erythropoietin Hybridized with Magnetic Nanocarriers for the Treatment of Central Nervous System Injury: A Literature Review. International Journal of Nanomedicine. 2020;Volume 15, 9683–9701. <https://doi.org/10.2147/IJN.S287456>
  33. Fisher, J. W. (2003). Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. Experimental Biology and Medicine, 228(1), 1–14. doi:10.1177/153537020322800101

34. Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F. J., & Barcia, J. M. (2014). Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/102158
35. Mijnhout, G. S., Scheltens, P., Diamant, M., Biessels, G. J., Wessels, A. M., Simsek, S., ... Heine, R. J. (2006). Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia*, 49(6), 1447–1448. doi:10.1007/s00125-006-0221-8
36. Kodl, C. T., & Seaquist, E. R. (2008). Cognitive Dysfunction and Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 29(4), 494–511. doi:10.1210/er.2007-0034
37. Morley, J. E. (2017). Diabetes: The diabetic brain. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 570–571. doi:10.1038/nrendo.2017.111
38. Kitada, M., & Koya, D. (2013). SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Diabetes & Metabolism Journal*, 37(5), 315. doi:10.4093/dmj.2013.37.5.315
39. Zhong, Y., Lee, K., & He, J. C. (2018). SIRT1 Is a Potential Drug Target for Treatment of Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00624
40. Chong, Z. Z., Wang, S., Shang, Y. C., & Maiese, K. (2012). Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways. *Future Cardiology*, 8(1), 89–100. doi:10.2217/fca.11.76
41. Revollo JR, Li X. The ways and means that fine tune Sirt1 activity. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013 Mar;38(3):160-167. DOI: 10.1016/j.tibs.2012.12.004. PMID: 23394938; PMCID: PMC4102005.
42. Juenemann M, Braun T, Schleicher N, Yeniguen M, Schramm P, Gerriets T, et al. Neuroprotective mechanisms of erythropoietin in a rat stroke model. *Translational Neuroscience*. 2020;11(1), 48–59.
43. Meng, X., Tan, J., Li, M., Song, S., Miao, Y., & Zhang, Q. (2016). Sirt1: Role Under the Condition of Ischemia/Hypoxia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(1), 17–28. doi:10.1007/s10571-016-0355-2
44. Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), 15924–15929. doi:10.1073/pnas.1207767109

45. Hyman, C., Hofer, M., Barde, YA. et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350, 230–232 (1991). <https://doi.org/10.1038/350230a0>
46. Hempstead B. L. (2015). Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 126, 9–19.
47. Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B., & Bekinschtein, P. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. doi:10.3389/fncel.2019.00363
48. Svob D., Konjevod M, Konjevod T. et al. (2020). Neurosteroidi dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) i neurotrofni moždani čimbenik (BDNF) u Alzheimerovoj bolesti.
49. Quinn T. A., Robinson S. R., Walker D. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA Sulfate: Roles in Brain Function and Disease. (2018) doi: 10.5772/intechopen.71141
50. Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 227–241. doi:10.1002/wsbm.1331
51. Dorrington, M. G., & Fraser, I. D. C. (2019). NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00705
52. Ghashghaieinia M, Toulany M, Saki M, Rodemann HP, Mrowietz U, Lang F, et al. Potential roles of the NFκB and glutathione pathways in mature human erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett*. (2012) 17:11–20. doi: 10.2478/s11658-011-0032-x
53. Maiese K. (2015). Erythropoietin and diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 6(14), 1259–1273. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i14.1259>
54. Chong, Z. Z., Shang, Y. C., Wang, S., & Maiese, K. (2012). SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(2), 167–178. <https://doi.org/10.1517/14728222.2012.648926>
55. Mohamed N.A., Shehata M.I., El-Sawaf A.L. et al. (2018). The Ameliorating Effect of Erythropoietin on Diabetic Neurodegeneration by Modulating the Antioxidant-Oxidant Imbalance and Apoptosis in Diabetic Male Rats. *ISSN 1995-6673*; 339 - 345
56. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF-κB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023 (2017). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

57. Yang, Y., & Gao, L. (2017). Celecoxib Alleviates Memory Deficits by Downregulation of COX-2 Expression and Upregulation of the BDNF-TrkB Signaling Pathway in a Diabetic Rat Model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(2), 188–198. doi:10.1007/s12031-017-0922-0
58. Wu, W., Wang, X., Xiang, Q., Meng, X., Peng, Y., Du, N., ... Liu, X. (2014). Astaxanthin alleviates brain aging in rats by attenuating oxidative stress and increasing BDNF levels. *Food Funct.*, 5(1), 158–166. doi:10.1039/c3fo60400d
59. Lappin, T. (2003). The Cellular Biology of Erythropoietin Receptors. *The oncologist*. 8 Suppl 1. 15-8. doi:10.1634/theoncologist.8-suppl\_1-15.



## 8. Popis skraćenica i akronima

BDNF - moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

EPO - eritropoetin

EpoR - eritropoetinski receptori

FOXO - (engl. *Forkhead Box O*)

GM-CSF - faktor stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GUP nt - glukoza u plazmi natašte

GUP pp - glukoza u krvi postprandijalno

IGF-1 - (engl. *insulin-like growth factor 1*)

HDAC - histonske deacetilaze

IκB - inhibitor kapa B

IKK - IκB kinaza

IL - interleukin

mBDNF - zreli BDNF (engl. *mature BDNF*)

MODY - dijabetes zrele dobi kod mladih (engl. *maturity-onset diabetes of the young*)

NAD<sup>+</sup> - nikotinamid adenin dinukleotid

NAM - nikotinamid

NAMPT - nikotinamid fosforibosiltransferaza

NF-κB - nuklearni faktor-kapa B

NGF - faktor rasta neurona (engl. *nerve growth factor*)

NMNAT - nikotinamid mononukleotid adenililtransferaza

NDM - neonatalni dijabetes

OGTT - test opterećenja glukozom

PNDM - trajni neonatalni dijabetes (engl. *permanent neonatal diabetes mellitus*)

proBDNF - prekursor BDNF

rhEPO - rekombinantni humani eritropoetin

ROS - reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SCF - faktor matičnih stanica (engl. *stem cell factor*)

Sir2 - (engl. *silent mating type information regulation 2*)

SIRT1 - Sirtuin 1 (engl. *silent information regulator two protein 1*)

STZ - streptozotocin

TNDM - privremeni neonatalni dijabetes (engl. *transient neonatal diabetes mellitus*)

TrkB - tirozin kinaza B receptor

WB - western blot

## **9. Životopis**

### **LUCIJA LOVRIĆ**

Lucija Lovrić je rođena 14. veljače 1998. godine u Slavonskom Brodu. Osnovnoškolsko obrazovanje završava 2012. godine u Slavonskom Brodu. Srednjoškolsko obrazovanje je završila 2016. godine u Klasičnoj gimnaziji fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti, također u Slavonskom Brodu. Iste godine upisuje Zdravstveno veleučilište Zagreb, smjer sanitarno inženjerstvo, gdje je 2019. godine stekla naziv stručni prvostupnik (baccalaureus) sanitarnog inženjerstva (bacc. sanit. ing.). U toj godini se upisuje na Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva.

Tijekom fakultetskog obrazovanja pohađa seminare, kongrese i tečaje, od čega je većina bila povezana sa stručnim obrazovanjem (Konferencija zdravstvenih profesija „Global Nursing and Healthcare“ u Opatiji; Međunarodna konferencija Dani kriznog upravljanja u Šibeniku...). Od ostalih aktivnosti, najviše se posvećuje sportskoj gimnastici gdje je najprije dvanaest godina sudjelovala na natjecanjima kao natjecateljica, a kasnije kao pomoćni trener i licencirani sudac sportske gimnastike.

Uz obrazovanje je volontirala, kako u aktivnostima vezanim za sport, tako i u kriznim situacijama (poplave u Slavoniji, pandemija Covid-19 virusa...). Krajem 2020./početkom 2021. godine je volontirala na Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju u KBC Rijeka i u Centru za proteomiku. Od ožujka 2021. godine obavlja razne studentske poslove (vezane za virus Covid-19) na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije.