

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Anja M. Petrović

**ULOGA HMGB1 PROTEINA U MODIFIKACIJI I
INTEGRACIJI SIGNALNIH PUTEVA APOPTOZE I
AUTOFAGIJE U ĆELIJAMA JETRE PACOVA SA
INDUKOVANIM DIJABETESOM**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Anja M. Petrović

**THE ROLE OF HMGB1 PROTEIN IN THE
MODIFICATION AND INTEGRATION OF
SIGNALING PATHWAYS OF APOPTOSIS AND
AUTOPHAGY IN LIVER CELLS OF DIABETIC
RATS**

-Doctoral dissertation-

Belgrade, 2017.

MENTORI

dr Ilijana Grigorov, naučni savetnik
Odeljenje za molekularnu biologiju
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Ilijana Grigorov, naučni savetnik
Odeljenje za molekularnu biologiju
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Poznanović, naučni savetnik
Odeljenje za molekularnu biologiju
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu“; potprojekat „Ekspresija i signalne uloge proteina HMGB1 u dijabetičnoj jetri”. (ON173020, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije).

This doctoral dissertation was performed in the Department of Molecular Biology of the Institute for Biological Research "Siniša Stankovic", University of Belgrade, within the project entitled: "Signaling molecules in diabetes: search for potential targets in intrinsic pathways for prediction and intervention in diabetes"; subproject: "HMGB1 expression and signaling in diabetic liver". (No. 173020, Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia).

Najlepše hvala,

Mojom mentorki dr Ilijani Grigorov što mi je otvorila vrata nauke i bila uz mene od početka do kraja izrade ove doktorske disertacije. Iako ponekada rad sa mnom nije bio lak hvala na bezgraničnom strpljenju, odvojenom vremenu, konstruktivnim razgovorima, razmeni ideja i na svemu što me je naučila kao i na korisnim savetima i kritikama koje će od mene napraviti boljeg naučnika. Još jednom veliko hvala na ogromnom trudu, veri u moj rad i nesebičnoj podršci!

Dr Goranu Poznanoviću koji je primivši me u svoj tim omogućio ostvarivanje ovog doktorata kao i na svim savetima prilikom izrade istog. Hvala na pruženoj prilici.

Prof. dr Gordani Matić na svim savetima i podršci. Hvala Vam neizmerno na tome!

Dr Svetlani Ivanović-Matić, dr Desanki Bogojević, dr Vesni Martinović i Tanji Živić koje su bile uz mene i naučile me timskom radu i kolegijalnom odnosu. Hvala na svojoj pomoći, savetima i podršci koja nikada nije izostala kada mi je trebala.

Dr Mirjani Mihailović na svim razgovorima, razumevanju i što je uvek bila uz mene sa pravim savetom i apsolutnom podrškom! Na tome sam joj bezgranično zahvalna.

Sofiji Jovanović Stojanov na uključenosti u moj rad, što je delila sa mnom sve moje muke i nedoumice i što, koliko god da je bilo naporno biti pored mene, je uvek znala da me smiri pravim rečima i osmehom. Hvala iznad svega na optimizmu koji je meni često nedostajao i predivnom prijateljstvu!

Jeleni Stevanović na svojoj pomoći, nepresušnoj energiji, hidrataciji i prvenstveno divnom novom prijateljstvu.

Marku, Sonji, Ljupki, Sanji, Bokiju, Zoki i Mikiju na konstruktivnim razgovorima, idejama i što su uvek bili uz mene. Hvala vam na podršci i na privilegiji da vas mogu nazvati svojim prijateljima sa kojima mogu da podelim sve lepe i ne tako lepe trenutke i pauzu za ručak.

Dr Neveni Grdović, dr Meliti Vidaković, dr Svetlani Dinić, dr Aleksandri Uskoković i dr Jeleni Arambašić na nikada izostavljenom savetu i osmehu u laboratoriji.

Anji, Milošu, Jovani i Mari hvala što su boravak u laboratoriji učinili ne samo radnim već i zabavnim i što je vreme sa njima prolazilo brže.

Svim kolegama i koleginicama sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije i što čine ovo mesto prijatnim za rad.

Mojoj majci, sestri i Vanji kojima nikada neću moći da se odužim za безусловnu podršku, ljubav i razumevanje koje su mi pružili i što su mi davali snage kada mi je bilo neophodno. Bezgranično vam hvala na tome!

Mom ocu, dr Miodragu Petroviću što je u meni probudio ljubav prema nauci od malih nogu, što me je usmeravao kada sam delovala izgubljeno, što je umeo sa mnom kada niko drugi nije i što me je iznad svega nesebično voleo. Nedostaješ mi svaki dan, a sada posebno. Sve ovo je zbog tebe i za tebe. Hvala ti tata!

Uloga HMGB1 proteina u modifikaciji i integraciji signalnih puteva apoptoze i autofagije u ćelijama jetre pacova sa indukovanim dijabetesom

Sažetak

Ćelijska smrt je jedan od uzroka patoloških promena u jetri tokom dijabetesa. Protein koji može imati važnu ulogu u ovim procesima, bilo kao marker nekroze ili aktivator signalnih puteva koji vode ćelijskoj smrti ili preživljavanju, je HMGB1. U vanćelijsku sredinu HMGB1 dospeva iz nekrotičnih, oštećenih ćelija i aktiviranih imunskih ćelija. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je uloga ovog proteina u određivanju profila ćelijske smrti u jetri pacova sa dijabetesom kroz njegov doprinos u modulaciji procesa apoptoze i autofagije. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je nivo HMGB1 proteina u serumu i jetri pacova sa dijabetesom u korelaciji sa nivoom oštećenja jetre i nekroze, što ga svrstava među potencijalne biološke markere za praćenje dijabetičnih komplikacija u jetri. Na aktivaciju procesa apoptoze i autofagije HMGB1 protein deluje dvojako, kroz aktivaciju nizvodnih signalnih puteva pokrenutih interakcijama vanćelijskog HMGB1 sa TLR4 i RAGE receptorima, i kroz uticaj citoplazmatskog HMGB1 na formiranje autofagozoma kroz interakcije sa Beklinom1. Pokazano je da nivo vanćelijskog HMGB1 proteina i njegov doprinos profilu ćelijske smrti u jetri zavisi od intenziteta prisutnog oksidativnog stresa. U uslovima oksidativnog stresa prisutnog u nelečenom dijabetesu, HMGB1 favorizuje puteve apoptoze i doprinosi ćelijskoj smrti i oštećenju jetre. Smanjenjem oksidativnog stresa i nivoa vanćelijskog HMGB1 melatoninom ili etil piruvatom, favorizuje se delovanje citoplazmatskog HMGB1 u pravcu protektivne autofagije i uklanjanja oštećenih unutarćelijskih struktura. Ovi podaci ukazuju na terapijski značaj melatonina i etil piruvata u regulaciji aktivnosti HMGB1 u dijabetesu i na ulogu HMGB1 proteina u regulaciji i povezivanju apoptoze i autofagije.

Ključne reči: HMGB1 protein, dijabetes, jetra, oksidativni stres, apoptoza, autofagija, nekroza.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

The role of HMGB1 protein in the modification and integration of apoptosis and autophagy signaling pathways in liver cells of diabetic rats

Abstract

Cell death underlies hepatic pathological changes in diabetes. HMGB1 is a protein with important roles in these changes, whether as a necrotic marker or a pathway activator determining cell death or survival. HMGB1 is released into the extracellular space by damaged or necrotic cells and activated immune cells. The role of HMGB1 in determining the profile of cell death in the liver of diabetic rats was studied by examining its role in the modulation of apoptosis and autophagy. The levels of HMGB1 protein in the serum and liver of diabetic rats correlate with the degree of necrosis and liver damage, thus rendering HMGB1 as a potential biological marker of diabetic complications. To activate apoptosis and autophagy, HMGB1 protein acts by stimulating downstream signaling pathways triggered by interactions of extracellular HMGB1 with TLR4 and RAGE receptors, and through the activity of cytoplasmic HMGB1 on the formation of autophagosomes via interaction with Beclin1, which has a central role in autophagy. Extracellular expression of HMGB1 and its contribution to the cell death profile in the liver depends on the level of oxidative stress. In oxidative stress accompanying untreated diabetes, HMGB1 promotes apoptosis and resulting liver damage. The reduction of oxidative stress by melatonin and HMGB1 release by ethyl pyruvate stimulates the cytoprotective role of cytosolic HMGB1 in autophagy activation. These results point to the therapeutic significance of melatonin and ethyl pyruvate in the regulation of HMGB1 activity in diabetes, and the role of HMGB1 in the regulation and interplay between apoptosis and autophagy.

Key words: HMGB1 protein, diabetes, liver, oxidative stress, apoptosis, autophagy, necrosis.

Research area: Biology

Area of special interest: Molecular biology

Skraćenice

AIF	(eng. apoptosis inducing factor)
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
ATP	adenozin trifosfat (eng. adenosine triphosphate, ATP)
Bad	(eng. Bcl-2 antagonist of cell death)
Bak	(eng. Bcl-2 antagonist/killer)
Bax	(eng. Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	(eng. B-cell leukemia/lymphoma 2)
Bim	(eng. Bcl-2-like protein)
Ca ²⁺	joni kalcijuma
CAD	(eng. caspase-activated Dnase)
CARD	(eng. caspase recruitment domain)
CAT	katalaza (eng. catalase)
Cys	cistein (eng. cysteine)
CXCL12	C-X-C motiv hemokin 12
DAMP	(eng. damage-associated molecular-pattern)
DISC	(eng. death-inducing signaling complex)
DT1	dijabetes tipa 1
DT2	dijabetes tipa 2
EndoG	endonukleaza G
EP	etil piruvat
ERK	(eng. extracellular signal-regulated kinase)
FADD	viso (eng. fas-associated protein with death domain)
FLIP	(eng. fllice inhibitory protein)
GR	glutation reduktaza (eng. glutathione reductase)
GSH	glutation u redukovanom obliku 1 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1

GSH-Px	glutation-peroksidaza (eng. glutathione peroxidase)
GSSG	glutation u disulfid-oksidovanom obliku
GST	glutation S-transferaza (eng. glutathione S-transferase)
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HE	hematokslin-eozin
HMGB1	(eng. High mobility group box 1)
HSP70	protein toplotnog šoka 70 (eng. <i>Heat shock protein 70</i>)
IFCC	(eng. international federation of clinical chemistry and laboratory medicine)
JNK	(eng. c-Jun N-terminal kinase)
LC3	(eng. microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)
LMPA	(eng. low melting point agarose)
LPS	lipopolisaharid
MDA	malonaldehid
MAPK	(eng. mitogen activated protein kinases)
MLKL	(eng. mixed lineage kinase domain-like protein)
MPTP	tranzicione mitohondrijalne permeabilizacije pore (eng. mitochondrial permeability transition pore)
m-TOR	(eng. mammalian target of rapamycin)
NAD ⁺ /H	oksidovani/redukovani nikotinamid adenin dinukleotid (eng. nicotinamide adenine dinucleotide)
NADP ⁺ /H	oksidovano/redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (eng. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NBT	nitro plavo tetrazolijuma (NBT)
NLS	(eng. nuclear localisation signal)
O ²⁻	superoksid anjon radikal
OH ⁻	hidroksil radikal
p-	fosfo grupa
PAMP	(eng. pathogen associated molecular patterns)
PARG	(eng. poly (ADP ribose) glycohydrolase)
PAR	poli-ADP-ribozni

PARP	(eng. poly-ADP-ribose polymerase)
PVDF	polivinildifluorid
RAGE	(eng. receptor for advanced glycation end products)
RIPK1/3	(eng. receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1/3)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxygen species)
SOD	superoksid dismutaza (eng. superoxide dismutase)
STZ	streptozotocin
TBA	tiobarbiturna kiselina (eng. thiobarbituric acid)
TBARS	reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (eng. thiobarbituric acid reactive substances)
TLR	(eng. toll like receptors)
TMB	tetrametilbenzidin
TNF- α	faktor nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor α)
TNFR	receptor za TNF
TRADD	(eng. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein)
TRAF2	(eng. TNF receptor-associated factor 2)
TRAIL	(eng. TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)
Vps34	(eng. vacuolar protein sorting)

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Diabetes mellitus	1
1.1.1.	Oksidativni stres u dijabetesu.....	3
1.1.2.	Odabrane vrste visoko reaktivnih produkata kiseonika u dijabetesu.....	6
1.1.3.	Antioksidativna zaštita u dijabetesu.....	8
1.1.4.	Poremećaji jetre tokom dijabetesa.....	10
1.2.	Tipovi ćelijske smrti.....	13
1.2.1.	Kliničke implikacije ćelijske smrti.....	16
1.2.2.	Molekularna osnova procesa apoptoze	17
1.2.2.1.	Spoljašnji put aktivacije apoptoze	21
1.2.2.2.	Unutrašnji put aktivacije apoptoze	22
1.2.2.3.	Uloga proteina familije Bcl-2 u regulaciji procesa apoptoze.....	23
1.2.2.4.	Proteoliza PARP-1 i njen značaj u apoptozi.....	26
1.2.3.	Autofagija	27
1.2.3.1.	Molekularne osnove makroautofagije/autofagije.....	29
1.2.3.2.	Selektivni oblici autofagije	31
1.2.3.3.	Pozitivna i negativna uloga autofagije u uslovima oksidativnog stresa.....	33
1.2.3.4.	Povezanost apoptoze i autofagije.....	35
1.2.4.	Molekularna osnova nekroze	38
1.2.4.1.	Pad energetskeg nivoa kao medijator nekroze.....	38
1.2.4.2.	Joni kalcijuma kao medijatori nekroze	39
1.2.4.3.	Slobodni radikali kao medijatori nekroze	40
1.2.4.4.	Programirana nekroza	41
1.3.	HMGB1 protein	42
1.3.1.	Mehanizmi oslobađanja HMGB1 u vanćelijsku sredinu.....	45
1.3.2.	HMGB1 i unutarćelijski putevi signalne transdukcije	47
1.3.3.	Vanćelijski HMGB1 i patološka stanja.....	50
2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	52
3.	MATERIJAL I METODE	55
3.1.	Primenjene hemijske supstance	55
3.1.1.	Streptozotocin	55
3.1.2.	Melatonin	56
3.1.3.	Etil-piruvat	57
3.2.	Eksperimentalne životinje, eksperimentalne grupe i protokol	58
3.2.1.	Eksperimentalne životinje.....	58
3.2.2.	Eksperimentalne grupe.....	58

3.2.3.	Protokol.....	58
3.3.	METODE.....	59
3.3.1.	Određivanje koncentracije insulina u serumu	59
3.3.2.	Određivanje serumske koncentracije ALT i AST	60
3.3.3.	Određivanje koncentracije O ²⁻ , H ₂ O ₂ i TBARS u homogenatima jetre.....	60
3.3.3.1.	Određivanje koncentracije O ²⁻	60
3.3.3.2.	Određivanje koncentracije H ₂ O ₂	61
3.3.3.3.	Određivanje koncentracije TBARS	61
3.3.4.	Određivanje DNK oštećenja u jetri pomoću komet eseja (eng. SCGE – single cell gel electrophoresis)	62
3.3.5.	Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri	63
3.3.5.1.	Određivanje aktivnosti CAT	63
3.3.5.2.	Određivanje aktivnosti SOD	64
3.3.5.3.	Određivanje aktivnosti GST	64
3.3.6.	Priprema ukupnog homogenata jetre.....	65
3.3.7.	Priprema citosolne i mitohondrijalne frakcije ćelija jetre	65
3.3.8.	Određivanje koncentracije proteina	66
3.3.9.	Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	66
3.3.10.	Prenos proteina na membrane	67
3.3.11.	Imunoblot analiza proteina.....	67
3.3.12.	Imunoprecipitacija	69
3.3.13.	Histološka priprema tkiva	70
3.3.13.1.	Histološka priprema tkiva za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju.....	70
3.3.13.1.1.	Hematoksin-eozin (HE) bojenje histoloških preparata	71
3.3.13.1.2.	Kolokalizaciona analiza histoloških preparata.....	71
3.3.13.2.	Histološka priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju.....	72
3.3.14.	In vivo detekciju apoptoze korišćenjem Apo-TRACE molekula	72
3.3.15.	Statistička obrada podataka.....	73
4.	REZULTATI.....	74
4.1.	Protektivni efekti tretmana melatoninom ili etil piruvatom kod pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom.....	74
4.1.1.	Preživljavanje životinja.....	74
4.1.2.	Uticaj melatonina i etil piruvata na održavanje telesne mase i težine jetre kod pacova sa dijabetesom	74
4.1.3.	Uticaj melatonina i etil piruvata na nivo insulina i glukoze	75
4.1.4.	Uticaj melatonina i etil piruvata na vrednosti serumskih markera oštećenja jetre	76
4.1.5.	Antioksidativan efekat melatonina u jetri pacova sa dijabetesom.....	77
4.1.5.1.	Uticaj melatonina na nivo O ²⁻ , H ₂ O ₂ i TBARS	77
4.1.5.2.	Uticaj melatonina na aktivnost antioksidativnih enzima	78
4.1.6.	Uticaj melatonina na stepen DNK oštećenja u ćelijama jetre pacova sa dijabetesom.....	79

4.2.	Prisutvo nekroze i vanćelijskog HMGB1 proteina u jetri dijabetičnih pacova	81
4.2.1.	Utvrđivanje prisustva nekroze histološkom analizom preseka tkiva jetre.....	81
4.2.2.	Imunoblot analiza PARP-1 proteina kao molekularnog markera nekroze, u ćelijama jetre pacova sa dijabetesom.....	83
4.2.3.	Imunoblot analiza HMGB1 proteina kao molekularnog markera nekroze u jetri pacova sa dijabetesom	84
4.3.	Prisustvo apoptoze u ćelijama jetre dijabetičnih pacova i uloga HMGB1 proteina u regulaciji ovog procesa	85
4.3.1.	<i>In vivo</i> detekcija prisustva apoptoze u jetri pacova sa dijabetesom	85
4.3.2.	Učešće HMGB1 proteina u aktivaciji apoptotske signalizacije u jetri pacova sa dijabetesom	87
4.3.2.1.	Interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 receptorom	87
4.3.2.2.	Promene u aktivnosti JNK signalnog puta posredovanog HMGB1/TLR4 interakcijama	88
4.3.2.3.	Aktivacija mitohondrijalnog puta apoptoze posredovanog HMGB1/TLR4 interakcijama i aktivacijom JNK	90
4.3.2.4.	Analiza odnosa Bax/Bcl2 kao markera prisustva apoptoze	93
4.3.3.	Inhibicija sekrecije HMGB1 proteina etil piruvatom i apoptotska signalizacija u jetri pacova sa dijabetesom.....	95
4.3.3.1.	Prisustvo HMGB1 proteina u serumu i jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana sa etil piruvatom	96
4.3.3.2.	Uticao etil piruvata na nivo interakcija HMGB1 proteina sa TLR4	97
4.3.3.3.	Inhibicija HMGB1 sekrecije i promene u aktivnosti JNK signalnog puta apoptoze	97
4.3.3.4.	Promene odnosa Bax/Bcl2 u uslovima tretmana pacova sa dijabetesom etil piruvatom.....	102
4.4.	Prisutnost autofagije u ćelijama jetre dijabetičnih pacova i uloga HMGB1 proteina	104
4.4.1.	Prisustvo autofagije u jetri dijabetičnih pacova	104
4.4.1.1.	Analiza prisustva autofagije transmisivnom elektronskom mikroskopijom	104
4.4.1.2.	Analiza prisustva autofagije preko LC3-II markera autofagije i degradacije p62 ..	106
4.4.2.	Učešće HMGB1 proteina u aktivaciji autofagije u jetri pacova sa dijabetesom	107
4.4.2.1.	Interakcije HMGB1 proteina sa RAGE receptorom	107
4.4.2.2.	Promene u aktivnosti ERK kinaze posredovane HMGB1/RAGE interakcijama....	108
4.4.2.3.	Uticao aktivacije ERK-a na protein-protein interakcije Beklin1 i Bcl-2 proteina u jetri pacova sa dijabetesom.....	110
4.4.2.4.	Analiza interakcija između Beklin1 i HMGB1 proteina u jetri pacova sa dijabetesom	110
4.4.3.	Inhibicija sekrecije HMGB1 proteina etil piruvatom i promene u aktivaciji autofagije u jetri pacova sa dijabetesom	115
4.4.3.1.	Analiza prisustva autofagije transmisivnom elektronskom mikroskopijom	115
4.4.3.2.	Analiza prisustva autofagije preko LC3-II markera autofagije.....	116
4.4.3.3.	Uticao etil piruvata na interakcije između HMGB1 i RAGE u jetri pacova sa dijabetesom.....	117

4.4.3.4.	Uticaj etil piruvata na HMGB1/RAGE posredovanu aktivaciju ERK signalnog puta 118
4.4.3.5.	Analiza interakcija između Beklin1 i Bcl-2 proteina u jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana etil puruvatom 119
4.4.3.6.	Analiza interakcija između Beklin1 i HMGB1 proteina u jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana etil puruvatom 120
5.	DISKUSIJA 125
6.	ZAKLJUČCI 139
7.	LITERATURA 141

1. UVOD

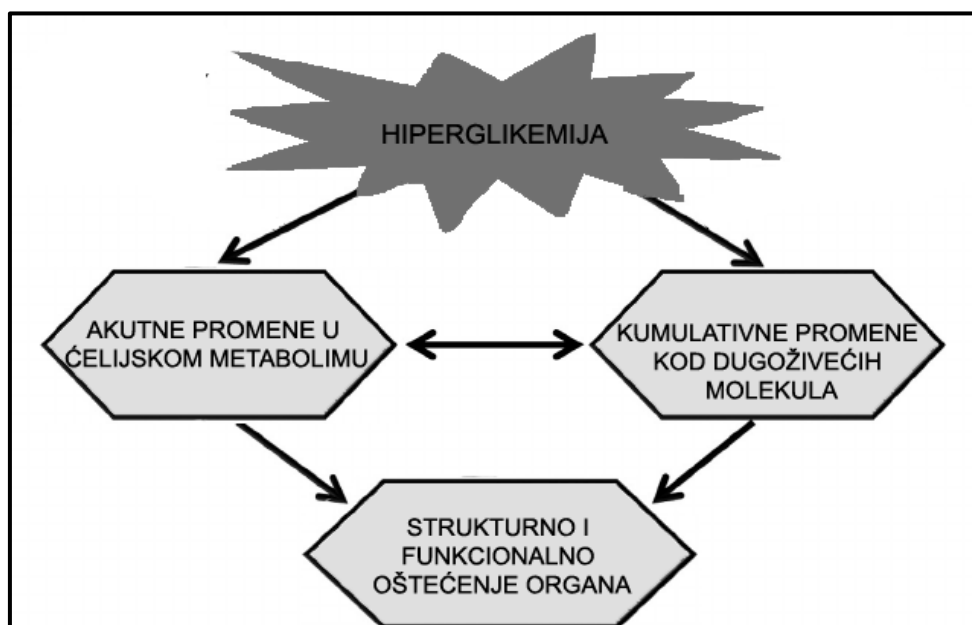
1.1. Diabetes mellitus

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji *diabetes mellitus* je metabolički poremećaj koga karakteriše stanje hronične hiperglikemije uzrokovano delovanjem genskih i mnogobrojnih faktora sredine koji najčešće deluju udruženo (Mehnert, 1980). Dijabetes je trenutno rangiran kao jedan od pet vodećih uzročnika smrti u svetu. Prevalenca dijabetesa se brzo uvećava i svetska zdravstvena organizacije predviđa da će se do 2030. god. broj obolelih od dijabetesa udvostručiti na svetskom nivou (Ozougwu i sar., 2013).

Glavni dijagnostički marker i uobičajena posledica nelečenog dijabetesa je povišen nivo šećera u krvi ili hiperglikemija. Hiperglikemija nastaje kao posledica nedostatka hormona insulina ili izmenjenog odgovora na ovaj hormon usled čega je i izvršena podela dijabetesa na dva osnovna tipa: insulin zavisani dijabetes ili tip 1 (DT1) koji nastaje usled smanjene ili potpuno obustavljene sinteze hormona insulina, i insulin nezavisani dijabetes ili tip 2 (DT2) koji nastaje usled smanjene osetljivosti ćelija ciljnih tkiva na insulin (Ozougwu i sar., 2013). U osnovi, DT1 je autoimuno oboljenje koga karakteriše potpuni gubitak β ćelija pankreasa koje proizvode insulin. Nestanak β ćelija u DT1 odvija se relativno brzo u poređenju sa smanjenjem broja funkcionalnih β ćelija u DT2 koga karakteriše progresivan gubitak funkcionalnosti β ćelija i postepeno smanjenje njihovog broja (Cooke i Plotnick, 2008). Pored ovih osnovnih oblika poznati su i drugi specifični oblici dijabetesa, poput gestacijskog dijabetesa koji se javlja tokom trudnoće kao posledica udruženog dejstva nekih genetskih faktora i hormona koji smanjuju osetljivost prema insulinu (Gilmartin i sar., 2008).

Glukoza predstavlja glavni izvor energije za ćelije, i efikasan ćelijski metabolizam zavisi od njene optimalne koncentracije u krvi koju reguliše insulin. Dejstvo insulina na brojne ćelije, uključujući nervne, mišićne i masne ćelije, kao glavne potrošače glukoze, rezultuje apsorpcijom glukoze iz krvi. Insulin takođe stimuliše deponovanje glukoze u jetri u vidu glikogena i sprečava oslobađanje endogene glukoze iz ćelija jetre kroz inhibiciju procesa razgradnje glikogena (glikogenolize) i *de novo*

sinteze glukoze (glukoneogeneze) iz masti i proteina (Meyer i sar., 2002). U skladu sa tim, hiperglikemija koja nastaje kao posledica izmenjene regulacije glukoze u organizmu predstavlja glavnu vezu između dijabetesa i poremećaja koji nastaju tokom dijabetesa, kao što su poremećaj u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i proteina u ćelijama (Giardino i sar., 1996). Kratkotrajna hiperglikemija dovodi do oštećenja preko mehanizma koji uključuje akutne promene u ćelijskom metabolizmu. Hronično izlaganje povišenoj koncentraciji glukoze dovodi do kumulativnih promena kod dugoživećih makromolekula u ćeliji, koje zaostaju i nakon uspostavljene homeostaze glukoze (Atkinson, 2012; El-Osta i sar., 2008). Oštećenjima na ćelijskom nivou hiperglikemija uzrokuje funkcionalna i strukturna oštećenja mnogih organa i organskih sistema. Gubitak glikemijske kontrole kod osoba koje boluju od dijabetesa povezan je sa dugoročnim komplikacijama i sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih, perifernih vaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja (Paneni i sar., 2013) kao i od retinopatije, nefropatije (Klein, 2006) i hepatopatije (Lall i sar., 2008).



Slika 1. Hiperglikemijom uslovljena oštećenja u ćelijama koja vode disfunkciji organa.

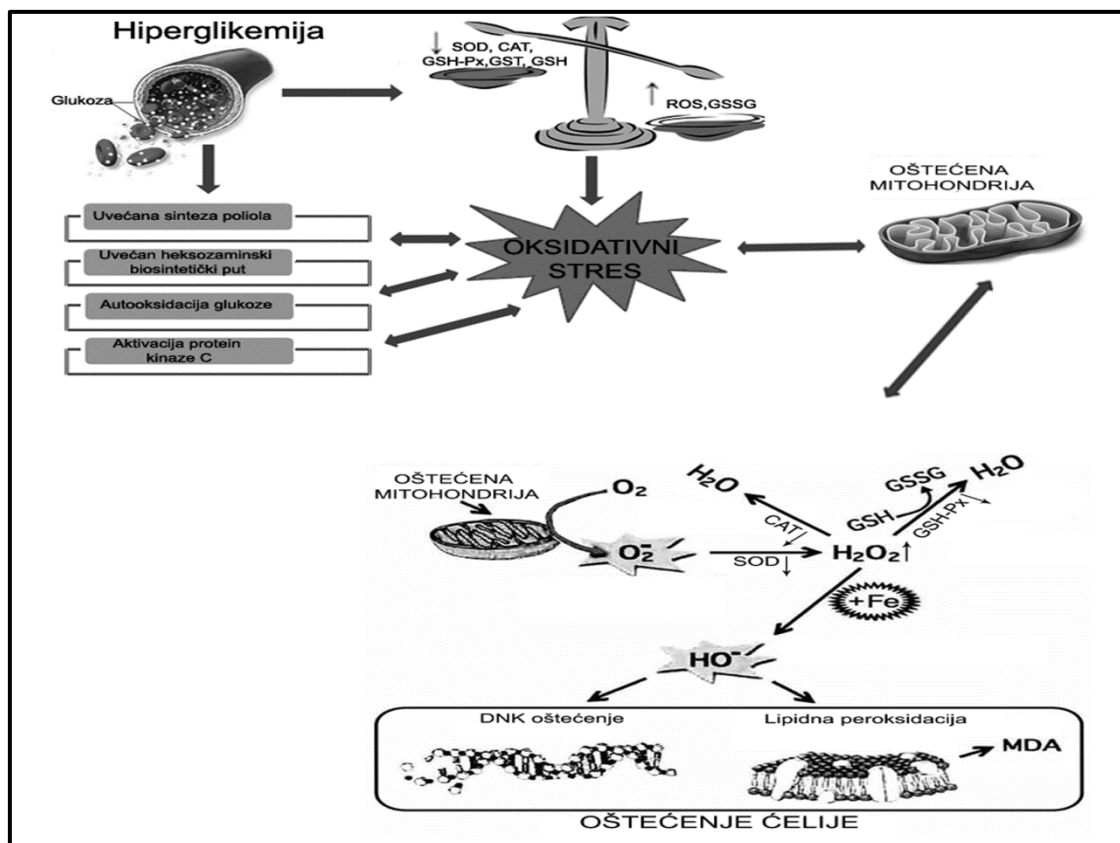
1.1.1. Oksidativni stres u dijabetesu

Gotovo sav preuzet kiseonik redukcijom se u organizmu sisara prevodi u vodu primanjem 4 elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu smeštenom na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Liu i sar., 2002; Solaini i sar., 2010). Energija oslobođena tokom ovog procesa se koristi za sintezu adenozin trifosfata (eng. adenosine triphosphate, ATP). Transport elektrona je lančani proces koji kroz redoks nosače respiratornog lanca (kompleksi I, III i IV) započinje od vodonika i završava enzimskim kompleksom citohrom C oksidaze (Burton i Jauniaux, 2011). Mitohondrijalni transportni lanac elektrona je jedan od najznačajnijih procesa u kome započinje stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (eng. reactive oxygen species, ROS). Molekulski kiseonik, difuzno prisutan u ćelijama, čvrsto je vezan za enzimski kompleks citohrom C oksidaze. Međutim, pošto ta veza na prenosiocima elektrona koji su u respiratornom lancu ispred sistema citohrom C oksidaze nije čvrsta, neki od transportovanih elektrona mogu da se prenose na molekulski kiseonik, što dovodi do nepotpune redukcije kiseonika i formiranja ROS. (Liu i sar., 2002; Solaini i sar., 2010; Burton i sar., 2011).

U normalnim uslovima ćelije neprestano proizvode ROS koje imaju važnu ulogu kao sekundarni glasnici u različitim signalnim putevima. Međutim, njihova prekomerna ili nekontrolisana produkcija dovodi do poremećaja u ćelijskom metabolizmu i do oštećenja ćelije (Solaini i sar., 2010; Asmat, 2016). S obzirom da su ROS nestabilni molekuli ili delovi molekula koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjem elektronskom omotaču, njihovo štetno delovanje potiče iz potrebe da postignu elektronsku stabilnost i zato reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom, uzimajući njegov elektron i stvarajući novi slobodni radikal. Tako susedni molekul i sam postaje nestabilan i dalje ulazi u reakcije sa drugim molekulima iz okruženja što dovodi do oštećenja ćelijskih komponenti (Asmat, 2016; Droge, 2002).

Hiperglikemija i nedostatak insulina, narušavajući metabolizam, stimulišu uvećanu proizvodnju ROS i dovode do smanjenja antioksidativne odbrane organizma (Busik i sar., 2008; Brownlee, 2001). U takvim uslovima, normalna ravnoteža pro-oksidativnog i anti-oksidativnog statusa ćelija je poremećena i dolazi do pojave oksidativnog stresa (Busik i sar., 2008). Hiperglikemija deluje putem nekoliko mehanizama koji indukuju pojavu oksidativnog stresa: remećenjem elektronskog

transportnog lanca u mitohondrijama što dovodi do povećane produkcije ROS u ćeliji; povećanjem aktivnosti heksozamin biosintetičkog puta (Brownlee, 2001; Kaneto i sar., 2001); aktivacijom protein kinaze C (Brownlee, 2001; Inoguchi i sar., 2000; Geraldles i King, 2010), uvećanjem sinteze poliola (Brownlee, 2001); autooksidacijom glukoze (autooksidaciona glikacija), koja podrazumeva sposobnost glukoze da u neenzimskim procesima reaguje sa proteinima dovodeći do redukcije molekulskog kiseonika u visoko reaktivne produkte kiseonika (Brownlee, 2001; Yasui i Sakurai, 2000; Nowotny, 2015). Takođe, neenzimska glikacija proteina, pre svega vanćelijske i unutarćelijske superoksid dismutaze (eng. superoxide dismutase, SOD), kao i drugih enzima antioksidativne zaštite rezultuje smanjivanjem njihove katalitičke funkcije (Negre-Salvayre i sar., 2009; Yan i Harding, 1999). Smanjenje koncentracije redukovanog glutationa zbog smanjenja aktivnosti glutation reduktaze još jedna je posledica ovog disbalansa (Robertson i Harmon, 2007). Niska koncentracija tiolnih jedinjenja, naročito glutationa, dovodi do poremećaja u redoks ćelijskoj signalizaciji i pozitivnoj regulaciji aktivnosti transkripcionog faktora NF- κ B (eng. nuclear factor-kappa B) odgovornog za stimulaciju ekspresije gena čiji produkti održavaju prooksidativno stanje u ćeliji (Robertson i Harmon, 2007). Oksidativna modifikacija strukturnih i funkcionalnih metaloproteina (transferina, ceruloplazmina, SOD vodi ka njihovoj ubrzanoj razgradnji, a oslobođeni metali, uključivanjem u Fentonovu reakciju, dovode do formiranja ROS (Kang, 2013a; Giles i sar., 2003). Proces glikacije hemoglobina vodi ka formiranju glikozilovanog hemoglobina (HbA1c), koji ima veliki afinitet za kiseonik i teže ga otpušta, zbog čega u perifernim tkivima nastaje hipoksija, čime se pokreće aktivacija ksantin oksidaze i drugih mehanizama koji iniciraju dalje stvaranje ROS (Nowotny, 2015).



Slika 2. Mehanizmi nastanka oksidativnog stresa i ćelijskog oštećenja tokom hiperglikemije. Pored aktivacije alternativnih puteva glukoze, hiperglikemija dovodi do oštećenja mitohondrija i remećenja antioksidativne zaštite, što rezultuje pojavom oksidativnog stresa, oštećenjem DNK, lipida i posledično cele ćelije. Preuzeto i prilagođeno iz (Cilenšek i sar., 2016 i iz Shimizu i sar., 2012).

Sa jedne strane, oksidativni stres može igrati značajnu ulogu u nastanku dijabetesa, odnosno biti uzrok njegove pojave vodeći progresivnom propadanju β ćelija pankreasa zaduženih za sintezu i sekreciju insulina, dok sa druge strane može biti posledica dijabetičnog stanja, odnosno hiperglikemije i kao takav vodi razvoju brojnih komplikacija. ROS nastao u uslovima hiperglikemije oštećuje ćelije na različite načine. Zavisno od intenziteta i obima, uvećana produkcija ROS može voditi ka adaptivnom odgovoru (indukciji antioksidativnih mehanizama odbrane) ili ozbiljnom remećenju metabolizma ćelije (prekid DNK lanca, povećanje unutarćelijskog slobodnog kalcijuma, oštećenja membranskih jonskih transportera i/ili drugih specifičnih proteina i lipidne peroksidacije) i posledično aktivaciji signalnih puteva koji vode do ćelijske smrti (Asmat, 2016; Brownlee, 2001).

Oksidativni stres predstavlja jedan od biohemijskih mehanizama kojim poremećen metabolizam glukoze ali i disregulacija ćelijske signalizacije dovodi do

razvoja komplikacija u dijabetesu, indukujući npr. dijabetičnu mikro i makroangiopatiju. Upravo ove hronične komplikacije dijabetesa produbljuju hipoksiju u perifernim tkivima i indukuju dalje generisanje ROS. Najveća oštećenja nastaju u onim tkivima koja glukozu preuzimaju nezavisno od prisustva insulina, kao što su retina, očno sočivo, nervi, endotel krvnih sudova. Hiperglikemija, kod pacijenata sa DT2, utiče naročito preko oksidativnog stresa na pojavu endotelne disfunkcije, kao inicijalnog događaja u razvoju ateroskleroze krvnih sudova, koja se mnogo brže razvija u odnosu na nedijabetičare i značajno pogoršava nakon svakog novog izlaganja hiperglikemiji (Asmat, 2016; Matough i sar., 2012).

1.1.2. Odabrane vrste visoko reaktivnih produkata kiseonika u dijabetesu

Među reaktivnim vrstama kiseonika koje su od posebnog značaja za nastanak dijabetičnih komplikacija izdvajaju se superoksid anjon radikal, vodonik peroksid i hidroksil radikal.

Superoksid anjon radikal (O_2^-) nastaje najvećim delom u respiratornom lancu mitohondrija, ali može nastati i u okviru kraćeg elektronskog transportnog lanca u okviru endoplazmatičnog retikuluma tokom sinteze proteina (Burton i sar., 2011; Cannio i sar., 2000). Najčešća je produkovana vrsta slobodnih radikala u živim organizmima, zbog čega se ovaj reaktivni metabolit kiseonika uglavnom nalazi na početku kaskade unutarćelijskog oksidativnog stresa (Cannio i sar., 2000). U ćelijama je vrlo toksičan za membranski sistem, jer oštećuje estarske veze između masnih kiselina i glicerola, vodeći ka oštećenju fosfolipida membrane. O_2^- podleže reakciji dismutacije u kojoj se stvaraju kiseonik i vodonik peroksid, dok u reakciji sa vodonik peroksidom uz prisustvo gvožđa, indirektno produkuje hidroksil radikal (Fentonova reakcija). U većoj koncentraciji dovodi i do oštećenja DNK, lipidne peroksidacije i inaktivacije enzima kao što su katalaza (eng. catalase, CAT), i glutation-peroksidaza (eng. glutathione peroxidase, GSH-Px). U organizmu se uglavnom uklanja enzimski pomoću enzima SOD (Noori, 2012).

Vodonik peroksid (H_2O_2) je najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Ne poseduje nesporeni elektron, pa u pravom smislu reči i nije slobodni radikal. Hemijski može nastati direktno dvoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika,

jednoelektronskom redukcijom O^{2-} , ili enzimskom dismutacijom pod dejstvom SOD (Wang i sar., 2012). Ima sposobnost da direktno oksiduje unutarćelijske komponente, a ima i mogućnost interakcije sa O^{2-} , uz stvaranje visoko reaktivnog hidroksil radikala u prisustvu gvožđa (Giles i sar., 2003). Inkubacija ćelija sa H_2O_2 izaziva oštećenje ćelijske membrane i mobilisanje kalcijuma, a predstavlja i glavni oksidans koji može da uđe u jedro i uzrokuje DNK oštećenja. Aktivnost H_2O_2 se može sprečiti aktivnostima CAT i GSH-Px koje ga razlažu, kao i delovanjem SOD koja uklanja O^{2-} (Noori, 2012; Wang i sar., 2012).

Hidroksil radikal (OH^\cdot) je najreaktivniji oblik ROS i u velikoj meri odgovoran za citotoksične efekte oksidativnog stresa. Ovaj radikal ima izuzetno kratak poluživot i može da interaguje sa svakim molekulom ili ćelijskom stukturom sa kojima, ograničen samo brzinom svoje difuzije, može da dođe u kontakt. Vršeci oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina u biološkim membranama, OH^\cdot inicira lančani proces lipidne peroksidacije, koji dalje vodi nastanku velikog broja slobodnih radikala. Jedan OH^\cdot može izazvati konverziju više stotina molekula masnih kiselina u lipidne hidroperokside koji dalje vode ka nastanku reaktivnijih produkata sa posledičnom destrukcijom bioloških membrana, membranskih proteina, receptora i enzima (Giles i sar., 2003). CAT i helatori gvožđa inhibiraju produkciju OH^\cdot , pa samim tim i oštećenje membrane. Lipidna peroksidacija predstavlja završni stadijum oštećenja ćelijske membrane i dovodi do narušavanja strukture ćelije što može dovesti do oslobađanja ćelijskog sadržaja (Avery, 2011). Jedan od pokazatelja lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), jedan od produkata peroksidacije lipida čija se detekcija veoma često koristi za određivanje nivoa lipidne peroksidacije, odn. za procenu stepena oksidativnog stresa (Avery, 2011).

1.1.3. Antioksidativna zaštita u dijabetesu

Proces oksidativne modifikacije proteina, ugljenih hidrata, DNK i lipida, ima biološki karakter, ali ako se intenzivira predstavlja univerzalni mehanizam oštećenja ćelije, posebno na nivou membrana. ROS ima brojne uloge u mnogim fiziološkim procesima u ćeliji, ali da bi se sprečilo njihovo prekomerno stvaranje, priroda je uspostavila zaštitni sistem koji je predstavljen skupom antioksidanasa u organizmu. Prema Halliwellu i Gutteridge-u (2006) glavni kriterijum po kome neko jedinjenje pripada antioksidativnom sistemu je sposobnost jedinjenja da u malim koncentracijama u poređenju sa supstratom koji se oksiduje, značajno odloži ili spreči njegovu oksidaciju. Ovom definicijom obuhvaćeni su ne samo enzimi, već i neenzimske komponente poput vitamina E, askorbata, β karotena, glutaciona, i metal-vezujućih proteina, kao i određene ćelijske organele (Halliwell i Gutteridge, 2007). Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja obuhvata:

1. Ćelijske organele (mitohondrije, lizozomi) koje odvajaju veće količine ROS od ostatka ćelije čime sprečavaju negativan efekat ovih molekula;
2. Ćelijske enzime kao što su SOD, CAT, GSH-Px, glutation reduktaza (eng. glutathione reductase, GR), glutation S-transferaza (eng. glutathione S-transferase, GST)
3. Visokomolekulske endogene antioksidante (transferin, feritin, haptoglobin, hemopeksin, albumin);
4. Niskomolekulske endogene antioksidante (glutacion, vitamin C, vitamin E, ubikvinon, β -karoteni, lipoična kiselina, melatonin, bilirubin, flavonoidi, mokraćna kiselina).

Enzimi zaštite od oksidativnih oštećenja čine primarnu antioksidativnu zaštitu, dok neenzimski antioksidansi predstavljaju sekundarnu liniju odbrane. (Cadenas, 1989). SOD je metaloprotein koji katalizuje dismutaciju O^{2-} u H_2O_2 i molekulski kiseonik. Kod sisara su identifikovane tri izoenzimske forme SOD:

1. Bakar, cink-zavisna SOD (CuZn SOD ili SOD1) – enzim prevashodno smešten u citoplazmi ćelija; najveću aktivnost postiže u mozgu, adrenalnim žlezdama, jetri, srcu i bubrezima.
2. Mangan zavisna SOD (Mn SOD ili SOD2) – lokalizovana isključivo u mitohondrijama aerobnih ćelija.
3. Vanćelijska SOD (eng. extracellular SOD, EC SOD ili SOD3) – ima veliki afinitet za heparin i prvo je detektovana u humanoj plazmi, limfi, i cerebrospinalnoj tečnosti (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

Osnovna biološka aktivnost CAT i GSH-Px zasnovana je na razlaganju toksičnog H_2O_2 . CAT je prisutna u svim tkivima sisara, pri čemu se visokom aktivnošću ovog enzima posebno ističu jetra i eritrociti. U ćelijama, CAT je pretežno lokalizovana u peroksizomima i mitohondrijama gde katalizuje reakciju prevođenja H_2O_2 do vode i molekuskog kiseonika. GSH-Px je enzim koji zajedno sa GST-om i GR-om zauzima centralno mesto u okviru glutacion redoks ciklusa koji predstavlja glavni put redukcije organskih hidroperoksida. GSH-Px katalizuje reakciju redukcije H_2O_2 do vode ili organskih hidroperoksida u alkohol u prisustvu redukovanog glutationa koji služi kao davalac elektrona. Aktivnošću GR vrši se stalna regeneracija redukovanog glutationa, budući da GR redukuje oksidovani glutation u redukovani glutation uz prisustvo redukovanog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (eng. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH). GST je multifunkcionalni enzim prisutan kod gotovo svih aerobnih organizama. Kod sisara je prisutan u svim tkivima, ali najveću aktivnost pokazuje u jetri. GST katališe konjugaciju redukovanog glutationa, preko sulfhidrilnih grupa, sa elektrofilnim centrima različitih supstrata, koji mogu biti ksenobiotici ili endogeni elektrofilni kao i produkti oksidativnih oštećenja organizma. Formiranjem konjugata nastaju hidrofilni metaboliti koji se mogu izlučiti iz organizma (Ng i sar., 2007; Beutler, 1982)

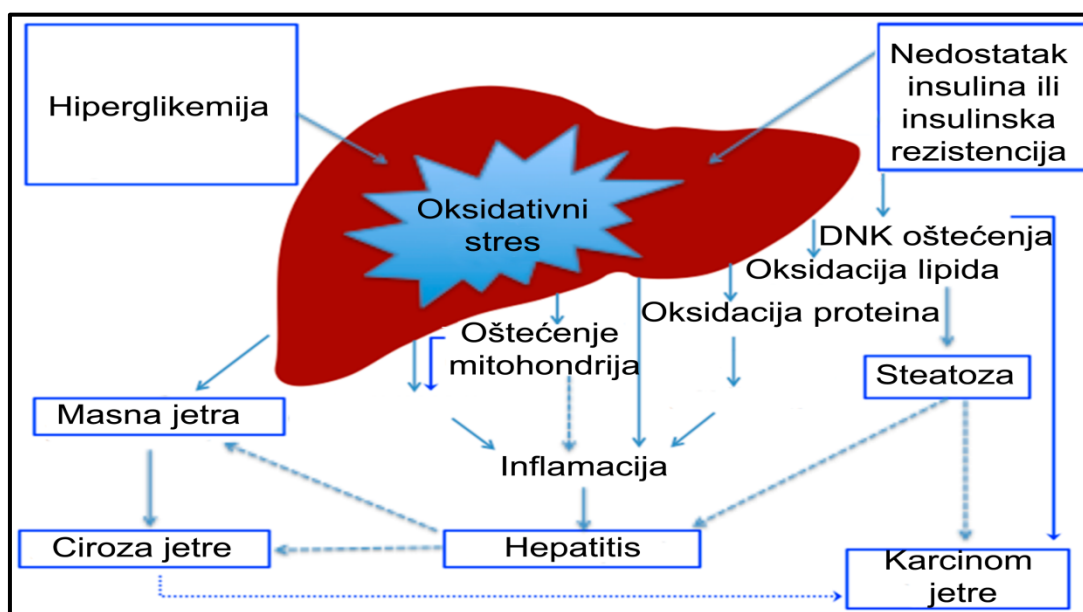
Jedan od najvažnijih neenzimskih antioksidanata, glutation, je tripeptid (gamma-L-glutamil-L-cistein-glicin) koji može da postoji u tiol-redukovanom (GSH) i disulfid-oksidovanom (GSSG) obliku (Bridgeman i sar., 1991). Oko 95% unutarćelijskog glutationa se nalazi u redukovanom obliku. GSH je ćeliji neophodan u sintezi i degradaciji proteina, formiranju dezoksiribonukleotidnih prekursora, u redukcionim procesima, kao i u regulaciji aktivnosti enzima.

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da u dijabetesu dolazi do pada aktivnosti antioksidativne zaštite koju, pre svega, karakteriše pad aktivnosti CAT i SOD i nivoa GSH. Smanjena aktivnost CAT dovodi do oksidativnog stresa u β ćelijama pankreasa i njihovog oštećenja. Ove ćelije su bogate mitohondrijama koje u ovakvim uslovima postaju značajan izvor ROS (Góth i Eaton, 2000). Patel i sar (2013) su pokazali da hiperglikemijom izazvano smanjenje aktivnosti ovog enzima u endotelijalnim ćelijama dovodi do veće produkcije H_2O_2 , hiperpolarizacije mitohondrijalnih membrana i smanjene ekspresije gena za CAT. Smanjenje aktivnosti CAT dovodi i do uvećanja DNK oštećenja i povećane aktivnosti apoptotskih signalnih puteva u ćelijama srca pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom (Ivanović-Matić i sar., 2014). Pad nivoa i aktivnosti SOD u krvi i dijabetičnim tkivima opisan je u brojnim radovima (Cilenšek i sar., 2016). Kim (2013) je pokazao da i kožu dijabetičara odlikuje mala količina vanćelijskog SOD, i zaključio da je ova izoenzimaska forma SOD odgovorna za njen izmenjen metabolički status. Smanjena aktivnost SOD opisana je i kod jetre pacova sa dijabetesom (Manna i sar., 2010). Takođe, pokazano je da smanjena aktivnost ovog enzima u bubrezima doprinosi razvoju dijabetične nefropatije (Fujita i sar., 2009). Smanjenje nivoa GSH smatra se jednim od bitnih faktora koji doprinose oksidativnim oštećenjima DNK u dijabetesu (Dinçer i sar., 2002). Abnormalni GSH status je uključen u disfunkciju β ćelija pankreasa i patogenezu dijabetičnih komplikacija. Najčešće opisane posledice smanjenja GSH/GSSG odnosa u dijabetesu su pojava hiperlipidemije, inflamacije i narušen antioksidativan profil (Das i sar., 2012).

1.1.4. Poremećaji jetre tokom dijabetesa

Kao jedan od ciljnih organa delovanja insulina, jetra zauzima važno mesto u regulaciji homeostaze glukoze i među prvim organima trpi posledice poremećaja metabolizma ovog šećera (Leclercq i sar., 2007). Tokom dijabetesa, usled izostanka insulinske signalizacije, jetra ne preuzima višak glukoze iz krvi, a sa druge strane nije u stanju da registruje prisutnu hiperglikemiju i dodatno oslobađa glukozu u cirkulaciju kroz procese glikogenolize i glukoneogeneze. Poremećeni metabolizam glukoze dovodi do oštećenja ovog organa usled aktivacije alternativnih puteva metabolizma glukoze i pojave oksidativnog stresa u samim ćelijama jetre. Takođe dolazi i do pojačanog preuzimanja slobodnih masnih kiselina iz krvi i sinteze triglicerida koji se akumuliraju u

jetri (El-Kadek i El-Dan Ashmawy, 2015). Porast u koncentraciji triglicerida dovodi do pojave mitohondrijalnog oksidativnog stresa i pojačane produkcije ROS u ćelijama jetre (Garcia-Compean i sar., 2009). Poznato je da sinteza ROS od strane aktiviranih Kupferovih ćelija jetre tokom odgovora na infekciju ima važnu ulogu u oštećenju jetre tokom dijabetesa, što smanjuje funkcionalnost ovog organa (Wei i sar., 2010). Međutim, istraživanja su pokazala da pored imunskih ćelija i parenhimske ćelije jetre doprinose nastanku oksidativnog stresa tokom različitih patoloških stanja usled uvećane produkcije ROS od strane oštećenih mitohondrija. (Bhogal i sar., 2010). Osobe sa dijabetesom su usled ovakvih poremećaja u funkcionalnosti jetre podložnije riziku oboljevanja od hepatitisa, ciroze, karcinoma jetre i masne jetre (Lall i sar., 2008).



Slika 3. Mehanizmi preko kojih oksidativni stres u dijabetesu dovodi do različitih bolesti jetre. Preuzeto i prilagođeno iz (Li i sar., 2015).

Oksidativni stres koji nastaje u uslovima hiperglikemije dovodi do oksidativnih promena u ćelijama jetre i na nivou nukleinskih kiselina (DNK), kao i lipida i proteina (Asmat, 2016). Oštećenja DNK predstavljaju najozbiljniju posledicu oksidativnog stresa u ćeliji jer mogu dovesti do pojave mutacija i genske nestabilnosti. Prekomerna produkcija ROS dovodi do DNK oštećenja bilo direktnim putem kroz interakciju sa bazama i formiranja oksidovanih produkata ili indirektno formiranjem lezija i prekida u okviru DNK lanca (Imlay i sar., 1988). Najbolje opisana promena DNK uslovljena

prisutnim oksidativnim stresom u ćeliji jeste oksidacija guanina koji je zbog svog niskog redoks potencijala vrlo podložan oksidativnim promenama. Glavni proizvodi oksidacije su 8-hidroksiguanin i 8-hidroksiguanozin. Obe forme su vrlo mutagene i vrlo kancerogene i mogu se upariti i sa cisteinom i sa adeninom formirajući GC i AT zamene u DNK lancu (Park i sar., 2001). ROS dovode i do oštećenja mitohondrijalne DNK (mtDNK) čime se narušava transkripcija mtDNK i sinteze izmenjenih proteina koji ulaze u sastav kompleksa mitohondrijalnog elektronskog transportnog lanca. To dovodi do formiranja disfunkcionalnih mitohondrija koje pojačanu sintetišu i oslobađaju ROS, što vodi ka daljim oštećenjima ovih organela i cele ćelije i održavanja oksidativnog stresa, sa ćelijskom smrću kao krajnjim ishodom (Lenaz, 2012). Kako ćelije jetre poseduju veliki broj mitohondrija jasno je da promene u funkcionalnosti ovih organela značajno doprinose oštećenjima ćelija jetre i remete funkcionalnost čitavog organa tokom dijabetesa. (Lenaz, 2012; Degli Esposti i sar. 2012).

Proteini u ćelijama jetre takođe trpe promene uslovljene oksidativnim stresom koje dovode do inhibicije njihove aktivnosti, pojačane osetljivosti ka agregaciji, otpornosti na proteolizu i umanjenog ili uvećanog transporta iz i u ćelije jetre (Yagmur i sar., 2006; Ahmed i sar., 2004). Cistein i metionin su dve amino kiseline koje su najosetljivije i mogu biti modifikovane od strane svih reaktivnih vrsta kiseonika (Witko-Sarsat i sar., 1998). Kako cistein ulazi u sastav mnogih metaboličkih enzima, kinaza, fosfataza kao i regulatornih proteina, oksidativne modifikacije cisteina mogu značajno da izmene funkcije proteina u ćeliji (Witko-Sarsat i sar., 1998; Zuwała-Jagiełło i sar., 2009). Različite studije su pokazale da jetra ima značajnu ulogu i u uklanjanju oksidovanih proteina i da je nivo produkata oksidacije proteina proporcionalan stepenu oštećenja jetre (Zuwała-Jagiełło i sar., 2009).

ROS dovode i do promena u lipidima formirajući produkte lipidne peroksidacije. Kako je najveća koncentracija lipida u ćelijskoj membrani, njihova oksidacija značajno narušava integritet same ćelije. (McAnuff i sar., 2005). Različiti aldehidi koji predstavljaju derivate lipidnih peroksida mogu biti indirektni pokazatelj količine produkata lipidne peroksidacije jer ukazuju na stepen oštećenja usled oksidativnog stresa, i na nivou tkiva i na nivou ćelija. Ovi aldehidi imaju duži polu-život od vrlo reaktivnih kiseoničnih vrsta, mogu slobodno cirkulisati kroz krvotok ili se inkorporirati u lipoproteine menjajući na taj način njihovu strukturu i funkciju. Produkti lipidne

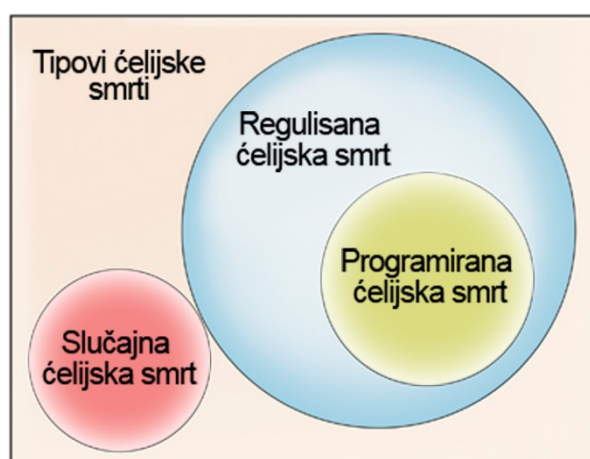
peroksidacije dovode do značajnog uvećanja u MDA i reaktivnim supstancama tiobarbitalne kiseline u jetri ljudi koji boluju od dijabetesa. Formiranje ovih produkata menja propustljivost ćelijske membrane i dovodi do oštećenja membranskih komponenti. Takođe, utiče i na membranske enzime i aktivnost membranskih receptora i dovodi do inflamacije i na kraju do ćelijske smrti nekrotskim putem (McNuf i sar., 2003).

Oksidativni stres kroz oštećenja na nivou DNK, proteina i lipida dovodi do različitih poremećaja u ćelijskom metabolizmu što za posledicu može imati poremećenu proliferaciju ćelija jetre kao i ćelijsku smrt. Ovi događaji leže u osnovi svih patoloških promena morfologije i funkcije jetre tokom dijabetesa (Garcia-Compean i sar., 2009).

1.2. Tipovi ćelijske smrti

Smrt ćelija može da nastane delovanjem patoloških činilaca, kao što su različiti fizički i hemijski agensi, mikroorganizmi, ili usled nedostatka neophodnih nutrienata, kada nastupi nepovratno oštećenje ćelije. Međutim, pored ovakve izazvane, „slučajne“ smrti ćelija, postoji i fiziološka smrt ćelija koja se zapaža u toku embrionalnog razvika, tokom procesa diferencijacije i u procesima razvoja i regulacije imunskog sistema. Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti (eng. the nomenclature committee on cell death, NCCD) je 2009. god dao predlog da se ćelija može smatrati mrtvom ako pokazuje neki od sledećih biohemijskih ili morfoloških kriterijuma: i) gubitak integriteta ćelijske mebrane, ii) fragmentaciju jedra i čitave ćelije i formiranje diskretnih (apoptotskih) telašaca, i/ili iii) da je telašce ili fragmenti ćelije u *in vivo* sistemu, obuhvaćeno susednom ćelijom (Kroemer i sar., 2009). Ćelijska smrt se može klasifikovati na osnovu i) enzimoloških kriterijuma – na smrt sa ili bez učešća nukleaza ili različitih proteaza poput kaspaza, kalpaina, katepsina i transglutaminaza; ii) sa funkcionalnog aspekta – na programiranu ili nasumičnu (fiziološku ili patološku); iii) na osnovu imunoloških karakteristika – na imunogenu i neimunogenu. Na osnovu morfoloških karakteristika, smrt ćelija se deli na tri tipa: tip I ćelijsku smrt ili apoptozu, tip II ili autofagiju i ćelijsku smrt tipa III ili nekrozu (ćelijsko ubistvo). Dok se nekroza ispoljava u ekstremnim nefiziološkim uslovima, apoptoza i autofagija javljaju se u toku fizioloških i u toku patoloških uslova. Osnovna razlika među njima ogleda se u činjenici da tokom apoptoze i autofagije ćelija aktivno učestvuje, odnosno da je za njihovo odvijanje potrebna

energija, dok je nekroza pasivan tip ćelijske smrti, koji nastaje usled kolapsa ćelijskih homeostatskih mehanizama. Zbog toga se za apoptozu i autofagiju često koristi termin programirana smrt ćelija ili ćelijsko samoubistvo. Međutim sve je više dokaza koji govore u prilog tome da i nekroza može biti programirana. Kaskada biohemijskih procesa je primećena kod različitih modela nekroze sugerišući postojanje programiranog mehanizma u ćeliji koja umire nekrozom. Iako ne postoji jasan konsenzus, neki autori su predožili termin “nekroptoza” za ovaj vid kontrolisane nekroze (Dunai i sar., 2011). Inhibicija određenih enzima i procesa u samoj ćeliji mogu da zaustave nekrotske promene, što svedoči u prilog da ti enzimi i procesi igraju aktivnu ulogu u nekrozi. Konačno, inhibicija kaspaza, glavnih proteolitičkih enzima apoptoze, može da dovede do promene ćelijske smrti apoptozom u nekrozu ili u ćelijsku smrt izazvanu autofagijom (Zieger i Groscurth, 2004).



Slika 4. Tipovi ćelijske smrti. Kod ćelija koja su izložene ekstremnim uslovima sredine dolazi do brzog gubika strukture i nekontrolisanog procesa umiranja koji se još naziva i slučajna ćelijska smrt. Sa druge strane, ćelijska smrt može biti genski kontrolisan proces i kao takva se naziva regulisana ćelijska smrt. Termin programirana ćelijska smrt je podtip regulisane ćelijske smrti. Preuzeto i prilagođeno iz (Galluzzi i sar., 2015).

Prema NCCD okarakterisani su i atipični modeli smrti ćelija :

„Nekroptoza“ (*necroptosis*), prvootkriveni programiran tip nekroze. Nekroptoza predstavlja zaštitni mehanizam ćelije od virusne infekcije omogućavajući programiranu ćelijsku smrt nezavisno od aktivacije kaspaza (Berghe i sar., 2014). Nekroptoza takođe predstavlja značajan faktor u inflamatornim bolestima kao što je Kronova bolest, pankreatitis i srčana insuficijencija. Aktivaciju ovog tipa regulisane nekroze indukuje

faktor nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor α , TNF α). Signalni put nekroptoze opisan je nakon otkrića protein kinaza RIPK1 (eng. receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1), i RIPK3 (eng. receptor interacting serine/threonine kinase 3) koje su ključne za TNF α indukovanu regulisanu nekrozu (Holler i sar., 2000). Produkcija TNF α tokom virusne infekcije stimuliše TNF α receptor 1 (TNFR1). Nakon vezivanja TNF α za receptor, TNFR1 pridružen protein smrti aktivira i signalizira RIPK1 proteinu koji regrutuje RIPK3 čime se formira kompleks poznat još i kao nekrozom (Berghe i sar., 2014). Nekrozom zatim aktivira pro-nekroptotski protein MLKL (eng. mixed lineage kinase domain-like protein) tako što ga fosforiliše. MLKL dovodi do nekroptoze tako što se ugrađuje u lipidni dvosloj ćelijske membrane i membrane organela što dovodi do oslobađanja ćelijskog sadržaja u vanćelijski prostor (Su i sar., 2014) i do ćelijske smrti nekroptotskog fenotipa.

„Paraptoza“ (*paraptosis*) je tip programirane ćelijske smrti koji je indukovana aktivacijom IGF1R (eng. insulin growth factor 1 receptor), i karakteriše je izražena vakuolizacija citoplazme, bubrenje mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma. Proces se odvija u odsustvu kondenzacije hromatina i degradacije DNK, što predstavlja morfološke odlike nekroze (Gibson i Kraus, 2012). Međutim, ovaj tip ćelijske smrti karakteriše translokacija jednog od fosfolipida, fosfatidilserina sa citoplazmatične strane na spoljašnju stranu ćelijske membrane (Andrabi i sar., 2008). Ova translokacija je jedan od osnovnih biohemijskih markera apoptoze i predstavlja signal za fagocitozu što nije karakteristično za tipičnu nekrotsku ćeliju. Nekrotske ćelije se mahom uklanjaju pinocitozom čime se omogućava smrt ćelije bez proratne inflamacije. Smatra se da paraptoza predstavlja neinflamatorni oblik ćelijske smrti sa nekrotskim fenotipom umiruće ćelije.

“Piroptoza” (*pyroptosis*) je vid ćelijske smrti monocita, makrofaga i dendritskih ćelija inficiranih različitim mikrobiološkim patogenima (Brennan i Cookson, 2000). Do piroptoze dolazi usled stvaranja osmotskog pritiska od strane formiranih pora u ćelijskoj membrani čije je formiranje zavisno od prisustva aktivirane kaspaze 1. Za kaspazu 1 je poznato da ne učestvuje u procesu apoptoze već u imunskom odgovoru. Ove pore dovode do promene u gradijentu ćelijske membrane jer rasipaju ćelijske jone čime se menja osmotski pritisak što dovodi do brzog pucanja same ćelije i izlivanja sadržaja u vanćelijsku sredinu (Fink i Cookson, 2006)

“Pironekroza” (*pyronecrosis*) je nekrotična smrt makrofaga inficiranih sa *Shigella*-om koja se razlikuje od piroptoze po tome što ne zahteva aktivaciju kaspaze 1 ali zavisi od proteina ASC (eng. apoptosis-associated speck-like protein) koji ulazi u sastav inflamazoma, kao i od lizozomalnog proteina katepsina B. Kao rezultat aktivacije pironekroze dolazi do aktivne sekrecije kasnih proinflamatornih citokina iz ćelija koji dovode do pojave inflamacije (Dunai i sar., 2011).

“Mitotska katastrofa” (mitotic catastrophe) se dešava tokom ili neposredno nakon neregularne mitoze, a može voditi i u apoptozu i u nekrozu.

“Anoikis” (*anoikis*) je tip smrti ćelije uzrokovane gubitkom njenih veza sa okolnim ćelijama, i ima identične molekularne mehanizme kao apoptoza.

“Ekscitotoksičnost” (excitotoxicity) je smrt ćelija specifičan za neurone koji nastaje usled dejstva ekscitatornih aminokiselina i preopterećenja citoplazme neurona jonima kalcijuma. Karakteriše je aktivacija signalnih puteva smrti ćelije koji se poklapaju sa nekrozom ili apoptozom.

„Entoza“ (*entosis*) je oblik ćelijskog kanibalizma gde ćelija obuhvati susednu vitalnu ćeliju koja na kraju umire unutar fagozoma (Kroemer i sar., 2009).

1.2.1. Kliničke implikacije ćelijske smrti

Povreda ćelija, nastala kao posledica delovanja bilo fizičkih, biohemijskih ili bioloških agenasa ili zbog nedostatka vitalnih supstanci, indukuje ekspresiju gena čiji su produkti aktivni u procesu adaptacije na nastali stres. Interakcijom delovanja aktiviranog akutno faznog odgovora, proteina toplotnog stresa i antioksidativnih mehanizama određuje se sudbina ćelije. Unutarćelijski odgovor na povredu vodi određenim genskim ekspresijama koje su obično specifične za tip ćelija i povredu. Ovi ćelijski odgovori su uglavnom citoprotektivni ali mogu stimulisati pojavu apoptoze zavisno od intenziteta stresogenog signala. Ukoliko je intenzitet stresogenog stimulusa toliko jak da utiče na veliki broj ćelija, tada može doći i do nekroze sa pratećim inflamatornim odgovorom. Iz ovoga proizilazi da narušavanje kontrolnih mehanizama ovog sistema može dovesti do pojave bolesti (Kam i Ferch, 2000).

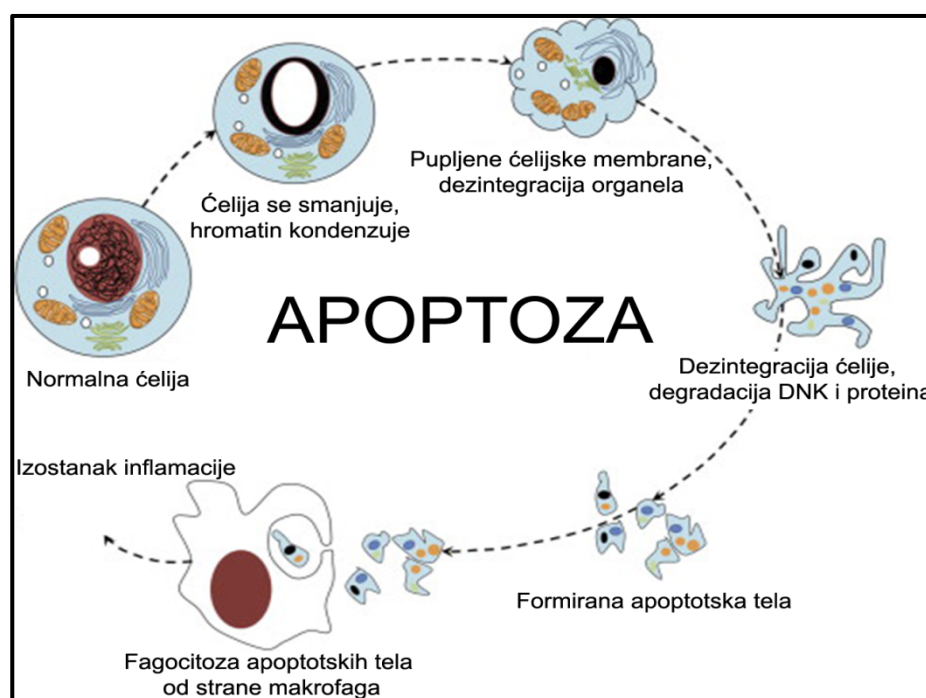
Poznato je da redukujući agensi, antioksidanti, antitela naspram TNF, steroidni antagonisti i inhibitori proteinske sinteze mogu regulisati apoptozu. Višegodišnjim

istraživanjima otkriveni su molekularni mehanizmi uključeni u poremećaje apoptoze i oni sugerišu da su mnoga hronična oboljenja, poput kancera kao i poremećaji nastali tokom fetalnog razvoja, posledica poremećene apoptoze i ćelijskog preživljavanja (Thompson, 1995). Smanjena apoptoza koreliše sa pojavom kancera, autoimunskim poremećajima i virusnim infekcijama, dok je stimulacija apoptoze uočena u ishemičnim tkivima i dovodi se u vezu sa kardiovaskularnim bolestima, infarktomiokarda, šlogom, neurodegenerativnim bolestima (Parkinsonovom i Alchajmerovom bolesti) i sepsom (Saikumar i sar., 1998; Iwahash i sar., 1997). Apoptoza je odgovorna za smrt ćelija u razviću, održavanje homeostaze tkiva, za atrofiju indukovanu endokrinim i drugim stimulusima i za negativnu selekciju u imunom sistemu. Mnogi terapijski agensi primenjeni za lečenje kancera ispoljavaju svoje efekte kroz inicijaciju apoptoze (Kam i Ferch, 2000). Takođe, ROS poput $O^{\cdot-}$, H_2O_2 , organskih peroksida i drugih radikala, su važni fiziološki efektori apoptoze (Circu i Aw, 2010). Apoptoza je bitna i za održavanje normalnog funkcionisanja epitela creva (Hildeman i sar., 2003). Deregulisana apoptoza je uočena u brojnim patološkim stanjima gastrointestinalnog trakta, poput ishemije/reperfuzije, autoimunskih bolesti jetre, u hroničnom virusnom hepatitisu, cirozi jetre i kanceru jetre (Wang i Lin, 2013). Zbog toga se javlja sve veća potreba za boljim razumevanjem molekularnih događaja koji leže u osnovi kontrole i odvijanja procesa apoptoze, ali i autofagije kojoj se poslednje decenije pridaje sve veća pažnja. Razlog leži u tome što autofagija može imati privremeno i zaštitni efekat u odgovoru na delovanje stresogenog stimula a sa druge strane može biti i oblik ćelijske smrti i sve je više dokaza koji govore u prilog njene povezanosti sa apoptotskim događajima u istoj ćeliji.

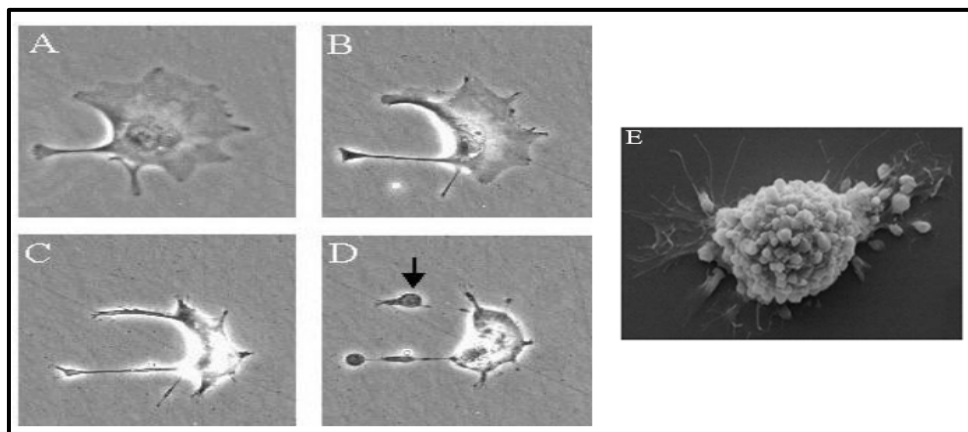
1.2.2. Molekularna osnova procesa apoptoze

Odigravanje apoptoze se odvija kroz niz molekularnih događaja koji vode ćelijskoj smrti uz izostanak inflamacije. Pre nego što ćelija odgovori na stimulus apoptozom u njoj se dešavaju karakteristične promene. U ranoj fazi ćelijska piknoza je vidljiva pod svetlosnim mikroskopom; ćelija se smanjuje, citoplazma postaje gušća i ispunjena organelama koje su naizgled normalne, hromatin je kondenzovan. Ćelije nastavljaju da se odupiru promenama i pakuju se u formaciju koja će biti fagocitirana od

strane makrofaga. Stoga, apoptotska ćelija podvrgava membranu karakterističnim promenama npr. translokaciji fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu membrane omogućavajući rano prepoznavanje takve ćelije od strane okolnih makrofaga što omogućava brzo uklanjanje ćelije (Elmore, 2007). Na površini ćelije se pojavljuju loptaste evaginacije, a u citoplazmi dolazi do degradacije proteina. Sav genetski materijal se cepa na male fragmente DNK dužine 50 do 300 baznih parova, čitava ćelija se raspada na mala, membranom obmotana telašca sa ili bez hromatina - apoptotska tela, koja će konačno biti fagocitirana od strane makrofaga ili okolnih ćelija (Bortner i sar., 1995).



Slika 5. Morfološke odlike apoptoze. Različite faze apoptotske ćelijske smrti započinju smanjenjem ćelije i kondenzacijom hromatina koja je praćena pupljenjem ćelijske membrane. Promene se nastavljaju u pravcu raspadanja ćelije i formiranja apoptotskih tela koja se zatim uklanjaju od strane aktiviranih makrofaga. Izostanak oslobađanja sadržaja ćelije u spoljašnju sredinu rezultuje u izostanku inflamacije. Preuzeto i prilagođeno iz (Abou-Ghali i Johnny Stiban, 2015).

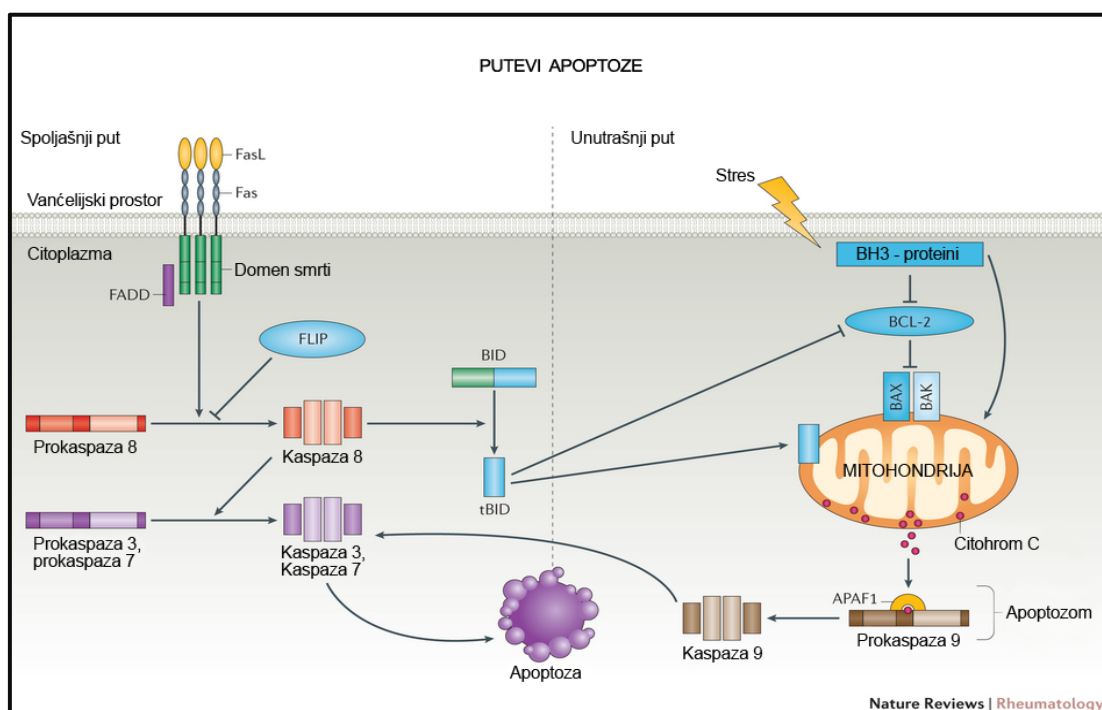


Slika 6. Elektromikrografski prikaz procesa apoptoze ćelije.(A); kariopiknoza (B); membrane formira nabore, vakuole i ekstenzije (C); odvajanje apoptotskih telašaca (D, ↓); (E) Izgled ćelije u kasnoj apoptozi. Preuzeto i prilagođeno iz (Bastian i sar., 2013).

Centralni događaj, ili tačka bez povratka u odigravanju apoptoze, jeste aktivacija proteolitičkog sistema kaspaza. Kaspaze čine grupu aspartat specifičnih cistein proteaza i prisutne su u gotovo svim ćelijama u neaktivnoj formi proenzima odnosno kao prokaspaze (Hengartner, 2000). Jednom aktivirane, sečenjem u okviru unutrašnjeg proteolitičkog mesta, često mogu aktivirati druge prokaspaze, što omogućava aktivaciju proteolitičke kaskade. Ova kaskada pojačava apoptotski signalni put i vodi do brze ćelijske smrti (Hengartner, 2000). Iako su svi članovi familije kaspaza slične u aminokiselinskoj sekvenci značajno se razlikuju prema svojim fiziološkim ulogama. Do danas, identifikovane subfamilije kaspaza su po svojoj biološkoj ulozi podeljene na inflamatorne (kaspaze 1, 4, 5 i 13) i apoptotske (kaspaze 3, 6, 7, 8, 9 i 10). U okviru apoptotskih razlikuju se inicijatorske kaspaze (kaspaza 2, 8, 9, 10), koje su odgovorne za pokretanje kaskadne reakcije aktivacije kaspaza, i efektorne kaspaze (kaspaza 3, 6, 7) koje proteolitički seku ćelijske substrate (Kang i sar., 2002; Hu i sar., 1998).

Aktivacija apoptoze može biti uslovljena različitim stimulusima. Odgovor ćelije na apoptotski signal zavisi od mnogih faktora a pre svega od vrste i jačine stimulusa, odnosa pro- i anti-apoptotskih proteina, kao i faze ćelijskog ciklusa (Wang i sar., 2013). Ulazak ćelije u apoptozu može biti posledica vezivanja nekog vanćelijskog signala (najčešće su to specifični liganidi) za komplementarne receptore na ćelijskoj membrani, nazvane receptorima smrti, koji dovode do aktivacije spoljnjeg puta apoptoze (Wang i sar., 2004). Apoptozu mogu izazvati i unutarćelijski signali koji mogu biti negativni (nedostatak faktora rasta, hormona, citokina i slično) ili pozitivni (prisustvo DNK

oštećenja, proteina sa neregularnom konformacijom ili agregacija proteina toksina, virusa, kiseoničnih radikala). Ove signale primaju proteini u kompleksu mitohondrijalnih pora i kao rezultat toga u citoplazmu izlaze proapoptotski faktori (citohrom C i dr.). Pod uticajem tih faktora, u citoplazmi se pokreće aktivacija enzima proteaza i kaspaza. Kaspaze odlaze u jedro gde zajedno sa endonukleazama cepaju molekul DNK na fragmente, što omogućava i morfološku detekciju apoptoze. Ovi događaji čine okosnicu unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze (Wang i sar., 2005; Saelens i sar., 2004).



Slika 7. Spoljašnji i unutrašnji put aktivacije apoptoze. Preuzeto i prilagođeno iz (Cuda i sar., 2016).

1.2.2.1. Spoljašnji put aktivacije apoptoze

Spoljašnji put apoptoze pokreće se preko receptora smrti koji se prostiru kroz čitavu ćelijsku membranu, od njene spoljašnje do unutrašnje strane. Pripadaju porodici TNF receptora (TNFR). Delovi receptora smrti smešteni u citoplazmi su veoma značajni u prevođenju signala iz spoljašnje sredine u ćeliju i odpočinjanje apoptoze (Locksley i sar., 2001). Zbog toga su ti citoplazmatski delovi označeni kao domeni smrti. Tokom prevođenja vanćelijskog signala prvi protein koji se pri tome aktivira jeste kaspaza 8 koja zatim izaziva kaskadnu aktivaciju drugih kaspaza. Naime, kada se specifični ligand veže za TNF receptor (TNF α , FasL) dolazi do konformacione promene domena smrti koji regrutuje različite apoptotske proteine i formira se signalni proteinski kompleks koji indukuje smrt (eng. death-inducing signaling complex, DISC) (Ashkenazi i Dixit, 1998). DISC dovodi do autokatalitičke aktivacije prokaspaze 8 koja aktivira efektorsku kaspazu 3 nakon čega dolazi do apoptoze (Kischkel i sar., 1995). Neki od poznatih liganata i njihovih receptora prikazani su u **Tabeli 1**.

Tabela 1. Ligandi i receptori spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze

Ligandima indukovana apoptoza	
Ligand	Receptor
FasL	Fas (CD95)
TNF	TNFR
TRAIL	TRAILR(DR4)

Najpoznatiji ligandi koji vezivanjem za svoje receptore indukuju proces apoptoze, predstavljaju TNF α (ligand za TNFR1 receptor) i Fas ligand (za receptor Fas poznat i pod nazivima CD95 i APO-1). Vezivanje TNF α na TNFR1 rezultuje trimerizacijom što vodi ka vezivanju intracelularnog adaptornog molekula TRADD (eng. tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein) preko interakcija sa domenom smrti. TRADD angažuje različite proteine na aktivirane receptore. Angažovanje TRAF2 (eng. TNF receptor-associated factor 2) vodi ka aktivaciji NF κ B i JNK (eng. c-Jun N-terminal kinase) signalnog puta. Adaptorni protein FADD (eng. fas-associated protein with death domain) je i direktno angažovan na Fas

receptoru koji je do sada najviše istražen. Njegov ligand - transmembranski protein CD95L ili FasL, može biti u solubilnoj formi ili vezan za membranu. Najverovatnije je da oba ova oblika CD95L-a mogu uputiti ćeliju u apoptozu (Kataoka i sar., 1998).

Fas/CD95, prokaspaza 8 (neaktivan oblik kaspaze 8 koja je protein adaptor za CD95) i CAP3 (za sada još nepotpuno okarakterisan protein) učestvuju u formiranju DISC-a. Prokaspaza 8 je heterotetramer, ona se autokatalitički cepa i aktivira u DISC-u, pri čemu se aktivne subjedinice p10 i p18 oslobađaju u citoplazmu. Pretpostavlja se da upravo ove aktivirane subjedinice iniciraju seriju proteoliza što dovodi do izvršenja apoptoze. Poznat je i TRAIL (eng. TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) ligand čiji su receptori DR4 i DR5.

1.2.2.2. Unutrašnji put aktivacije apoptoze

Unutrašnji put aktivacije apoptoze uključuje širok spektar nerekceptornih stimulusa koji preko mitohondrija kao glavnih organela u ovom procesu dovode do ćelijske smrti. Unutarćelijski stimulusi dovode do promena na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani što rezultuje otvaranjem mitohondrijalne permeabilizacione pore, gubitka mitohondrijalnog transmembranskog potencijala i oslobađanje dve glavne grupe pro-apoptotskih proteina iz unutarmembranskog prostora u citoplazmu (Du i sar., 2000).

Prvu grupu čine citohrom C, Smac/DIABLO i serin proteaza HtrA2/Omi. Ovi proteini aktiviraju kaspazno-zavisni mitohondrijalni put apoptoze. Citohrom C vezuje i aktivira Apaf-1 kao i prokaspazu 9 čime se formira „apoptozom“ (Chinnaiyan i sar., 1999). Smac/DIABLO i HtrA2/Omi promovišu apoptozu kroz inhibiciju anti-apoptotskih proteina (Schimmer, 2004). Formirani apoptozom aktivira efektorsku kaspazu 3 što omogućava odigravanje apoptoze.

Druga grupa pro-apoptotskih proteina, AIF (eng. apoptosis inducing factor), endonukleaza G (EndoG) i CAD (eng. caspase-activated dnase, CAD) se oslobađaju iz mitohondrija tokom apoptoze, ali ovo je kasni događaj koji se dešava nakon što ćelija odluči da umre. AIF se translocira u jedro gde dovodi do DNK fragmentacije i do kondenzacije hromatina (Jozsa i sar., 2001). EndoG se takođe translocira u jedro gde seče hromatin i formira oligonukleozomalne DNK fragmente (Li i sar., 2001). AIF i

EndoG funkcionišu nezavisno od kaspazne aktivnosti. CAD se nakon sečenja od strane kaspaze 3 translocira u jedro i fragmentiše DNK.

Rezultati eksperimentalnih istraživanja na brojnim različitim model sistemima su pokazali da je proces apoptoze regulisan značajnim brojem unutarćelijskih regulatora, tzv. modulatora apoptoze. Proteini familije Bcl-2, protein p53, proteinski produkti određenih onkogeni i gena regulatora ćelijskog ciklusa, zatim citohrom C, razni transkripcioni regulatori, određene klase fosfataza i kinaza predstavljaju samo neke od poznatih modulatora ovog procesa (Elmore, 2007).

1.2.2.3. Uloga proteina familije Bcl-2 u regulaciji procesa apoptoze

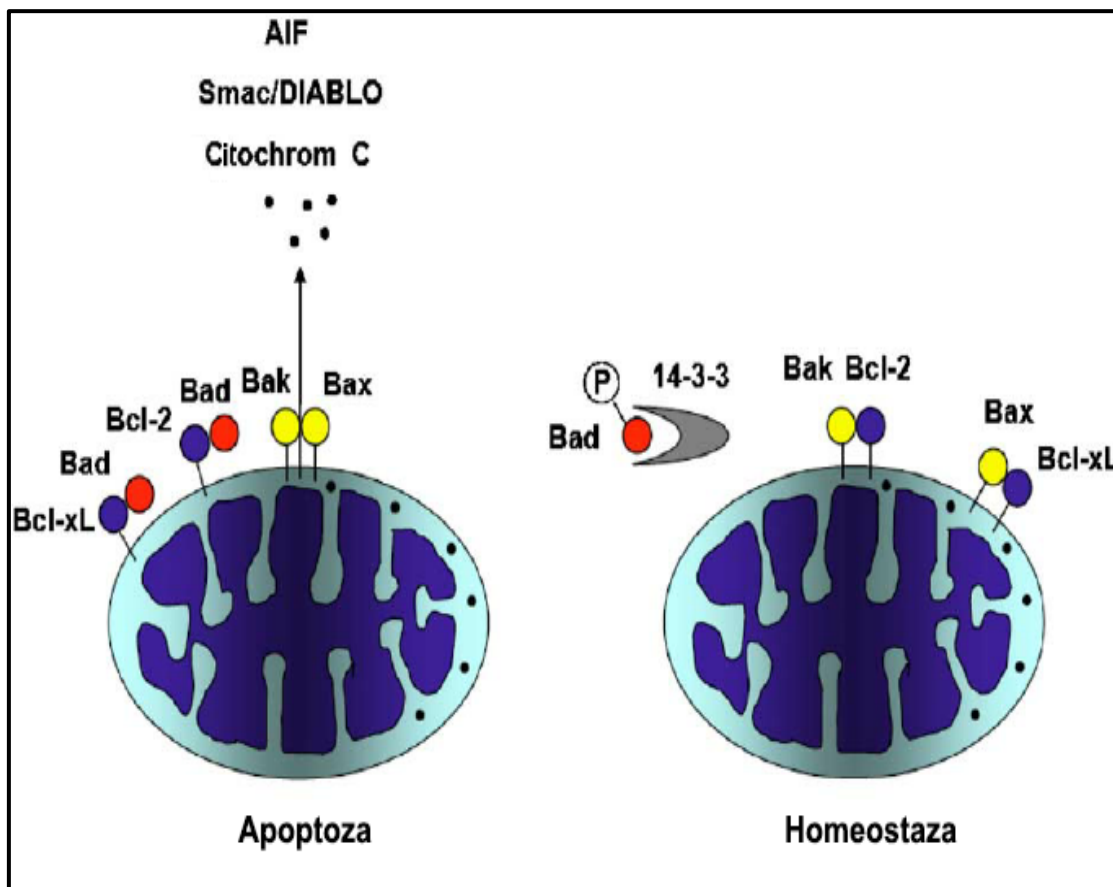
Proteini Bcl-2 familije ključni su unutarćelijski regulatori procesa apoptoze (Cory i Adams, 2002). Prvootkriveni član familije Bcl-2 bio je protein Bcl-2 (eng. B-cell leukemia/lymphoma 2). Bcl-2 je unutarćelijski protein lokalizovan u membranama mitohondrija, endoplazmatičnog retikuluma i u spoljašnjoj membrani jedra. Nakon proteina Bcl-2, otkrivena je čitava familija homolognih proteina od kojih neki imaju stimulatorni, a drugi inhibitorni efekat na proces apoptoze. Kao interagujući partner proteina Bcl-2, prvo otkriveni pro-apoptotski homolog bio je protein Bax (eng. Bcl-2-associated X protein). To je unutarćelijski protein pretežno lociran u citoplazmi. Članovi Bcl-2 familije poseduju barem dva konzervirana Bcl-2 homologa domena. Ovi im domeni omogućavaju interakcije kako međusobno tako i sa drugim članovima familije (Hockenbery i sar., 1991). Neki od anti-apoptotskih članova su Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-Xs, BAG a od pro-apoptotskih Bax, Bak, Bid, Bik. Značajnost ovih proteina se ogleda u tome što njihov balans u ćeliji odlučuje o senzitivnosti ćelije na apoptotski stimulus i aktivaciju unutrašnjeg puta apoptoze (Cory i Adams, 2002). Glavni mehanizam regulacije apoptoze od strane Bcl-2 familije jeste kontrolisanje oslobađanja citohroma C iz mitohondrija usled promena u propustljivosti membrane ovih organela. Pro-apoptotski Bcl-2 proteini su lokalizovani u citoplazmi gde reaguju kao senzori ćelijskog stresa ili oštećenja. Pro-apoptotski proteini Bax i Bak (eng. Bcl-2 antagonist/killer) koji poseduju tri Bcl-2 domena, su kritični faktori uvećanja propustljivosti mitohondrijalne membrane i oslobađanja citohroma C. Tokom indukcije procesa apoptoze, pod dejstvom apoptotskog stimulusa ovi proteini formiraju

homodimere koji formiraju kanale na spoljašnjoj membrani mitohondrija kojim se oslobađa citohrom C. U slučajevima kada je predominantno prisustvo proteina Bcl-2 u ćeliji, vezivanjem za protein Bax, ovi molekuli inhibiraju formiranje mitohondrijalnih membranskih kanala i oslobađanje citohroma C. Na osnovu ovih saznanja smatra se da je glavna biološka uloga proteina Bcl-2 u inhibiciji procesa apoptoze, kroz sposobnost vezivanja za protein Bax i heterodimerizacionu neutralizaciju njegovog pro-apoptotskog dejstva (Cory i Adams, 2002; Hockenbery i sar., 1991).

Drugi pro-apoptotski proteini poseduju samo jedan Bcl-2 homologi domen (BH3), npr. Bim (eng. Bcl-2-like protein) i Bad (eng. Bcl-2 antagonist of cell death) (Kim i sar., 2006). Ovi proteini sa jednim BH3 nakon detekcije apoptotskog signala vezuju pro-apoptotske članove Bcl-2 familije sa tri Bcl-2 domena, na taj način omogućavajući njihovu translokaciju na mitohondrije gde interaguju sa anti-apoptotskim proteinima Bcl-2 familije kao što je Bcl-2. Ove interakcije dovode do konformacione promene i otvaranja permeabilizacionih pora mitohondrija i oslobađanje citohroma C. Proteini koji sadrže samo jedan BH3 domen, na dva načina ostvaruju svoj pro-apoptotski efekat. Proteini Bad i NOXA inaktiviraju anti-apoptotske članove svoje familije procesom heterodimerizacije. Drugi članovi ove podfamilije (Bid, Bim i PUMA) direktno aktiviraju pro-apoptotske proteine Bax i Bak koji imaju sposobnost formiranja kanala na spoljašnjim membranama mitohondrija (Kuwana i sar., 2005). Pojedini autori smatraju da ključnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze ćelija sisara ima protein Bcl-X. Alternativnom obradom primarnog transkripta gena BCL-X moguće je dobiti dva različita proteina Bcl-X: duži (Bcl-XL) i kraći (Bcl-Xs). Protein Bcl-XL je strukturno i funkcionalno sličan proteinu Bcl-2. Drugi protein Bcl-Xs u heterodimernoj kombinaciji sa proteinom Bcl-2 funkcioniše kao njegov dominantni inhibitor (Michels i sar., 2013).

Oslobađanje citohroma C je posledica aktivacije modulatora apoptoze dejstvom unutarćelijskih signala smrti. Citohrom C je zbog svog pozitivnog dejstva na aktivaciju kaspaze 3 dobio naziv Apaf-2 (eng. apoptotic protease activating factor 2). U prisustvu adapterskog molekula - proteina Apaf-1, citohroma C i ATP-a dolazi do proteolitičke aktivacije prokaspaze 9 (poznate i kao Apaf-3). Protein-protein interakciju Apaf-1 i Apaf-3 omogućuju njihove homologe sekvence nazvane CARD (eng. caspase

recruitment domains, CARDs). U odsustvu citohroma C ova interakcija je blokirana zahvaljujući strukturnoj konformaciji molekula Apaf-1(Cai i sar., 1998).



Slika 8. Lokalizacija i interakcije proteina Bcl-2 familije u ćeliji tokom apoptoze i u normalnim uslovima.

Preuzeto i prilagođeno iz (Vanessa i sar., 2005).

1.2.2.4. Proteoliza PARP-1 i njen značaj u apoptozi

Nakon aktivacije, bez obzira da li signal potiče sa receptora smrti ili iz mitohondrija, inicijatorske kaspaze proteolitički aktiviraju efektorske kaspaze. Aktivacija ove proteolitičke mašinerije kontrolisano seče ciljne proteine među kojima su i enzimi uključeni u DNK reperaciju, poput PARP-a (eng. poly-ADP-ribose polymerase), kao i enzimi uključeni u replikaciju DNK, kao što je jedarni enzim DNK topoizomeraza II. Ovi proteini najčešće imaju jedno proteolitičko mesto specifično za kaspaze, pa proteolizom dolazi do njihove inaktivacije, što rezultuje morfološkim i biohemijskim promenama karakterističnim za apoptozu. (Mason i sar., 1998).

PARP je relativno velika familija proteina koju čini 17 strukturno i funkcionalno različitih članova. Sve enzime ove grupe odlikuju 4 domena: DNK vezujući domen sa dva cinkana prsta koji je odgovoran za vezivanje za DNK molekul i konformacione promene; mesto sečenja kaspazama; auto-modifikacioni domen neophodan za oslobađanje proteina sa DNK nakon katalize i za inaktivaciju izazvanu sečenjem; i katalitički domen bitan za procese polimerizacije. Aktivacija PARP-a se dešava usled metaboličkih, hemijskih i radijacijom nastalih oštećenja molekula DNK u vidu jednolančanih prekida. Svoju funkciju ovaj protein ostvaruje detekcijom tih prekida i signalizacijom enzimskoj replikacionoj mašineriji, tako što se N-terminus PARP proteina vezuje za oštećeni DNK molekul, konformacijski menja i u prisustvu NAD^+ i ATP-a započinje sintezu poli ADP riboznih (PAR) lanaca koji predstavljaju signal za različite reparacione enzime poput DNK ligaze III i DNK polimeraze β , kao i za „scaffold” proteine odnose proteine skele (Mason i sar., 1994). Nakon popravke PAR lanci se uklanjaju enzimom PARG (engl. poly (ADP ribose) glycohydrolase). U nastojanju da popravi oštećenje, PARP povećano troši ATP što može izazvati ćelijsku smrt nekrozom. Takođe, pojačano stvaranje PAR-a stimuliše oslobađanje faktora indukcije apoptoze, AIF, iz mitohondrija i aktiviranje procesa nezavisnih od kaspaza koji dovode do ćelijske smrti (Ha and Snyder, 1999; Bouchard i sar., 2003).

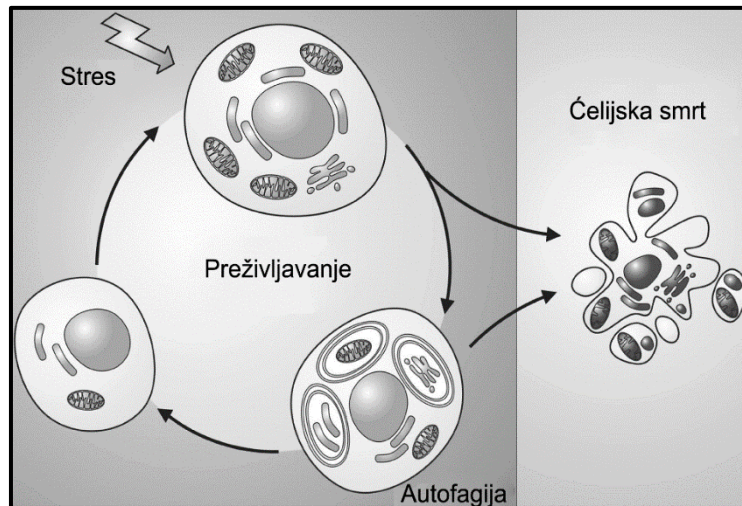
Kako bi se sprečila nekontrolisana aktivnost PARP proteina kada je DNK oštećenje nemoguće popraviti aktivira se apoptoza. Jedan od prvih proteina koji podleže proteolizi tokom apoptoze je PARP-1. Već u ranim fazama apoptoze dolazi do proteolitičkog sečenja PARP-1 nekom od kaspaza (3, 6 ili 7) na dve subjedinice različitih molekularnih masa: subjedinicu od 89 kDa koja sadrži auto-modifikacioni i

katalitički domen, i manju subjedinicu od 24 kDa sa DNK-vezujućim domenom. Ovakva proteoliza dovodi do razdvajanja DNK-vezujućeg od katalitičkog domena PARP-1, čime se enzim u potpunosti inaktivira (Lazebnik i sar., 1994). Cilj rane inaktivacije PARP-1 u apoptozi jeste da se očuva energija u vidu ATP-a koja je neophodna za određene faze apoptotskog procesa čime se sprečava nekrotska smrt i pojava inflamacije (Ha and Snyder, 1999; Lazebnik i sar., 1994).

1.2.3. Autofagija

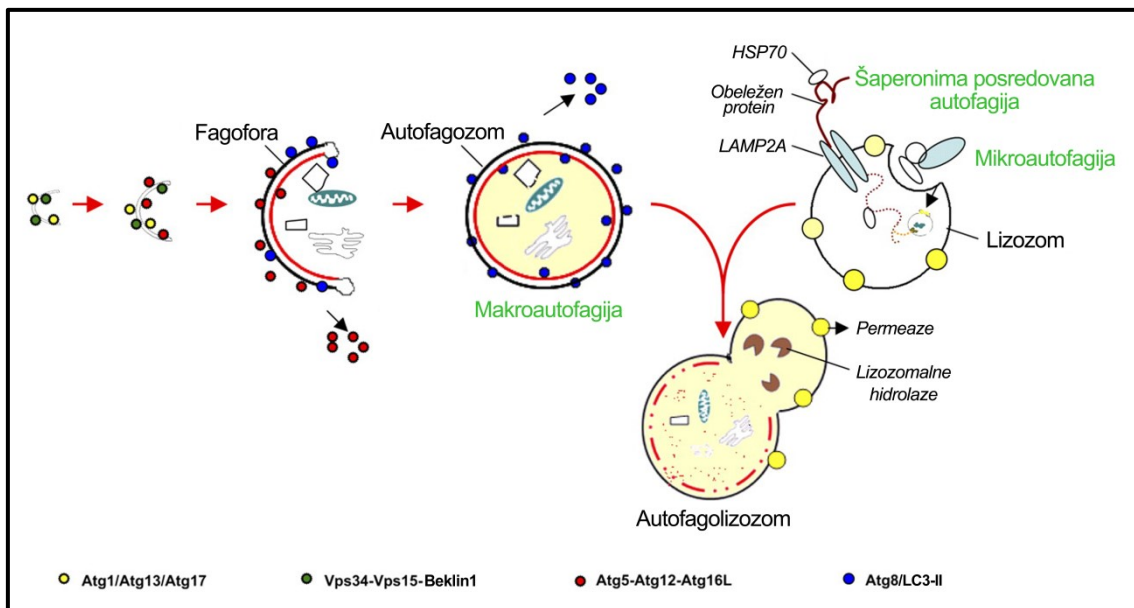
Dugo se smatralo da autofagija predstavlja programirani tip ćelijske smrti, ali u zavisnosti od tipa stresogenog stimulusa koji je aktivira kao i stanja same ćelije autofagija može obezbediti preživljavanje ćelije dok se homeostaza ponovo ne uspostavi. (Kaur i Debnath, 2015). Autofagija se definiše kao proces u kojem ćelija „jede samu sebe“ odnosno predstavlja put degradacije proteina i drugih ćelijskih komponenti, naročito za vreme stresa ili gladovanja. Za razliku od ubikvitin-proteozomalnog sistema koji specifično obeležava i uklanja kratko živeće proteine, autofagija degraduje dugo živeće proteine i organele kao što su endoplazmatični retikulum, mitohondrije, peroksizomi, jedro i ribozomi. (Mizushima i Klionsky, 2007; Stolz i sar., 2014). Tako je autofagija zajedno sa ubikvitin-proteozomalnim sistemom ključni mehanizam za očuvanje proteinske homeostaze i pravilnog funkcionisanja organela u ćeliji. Zato se mora istaći da je na bazalnom nivou određeni stepen aktivacije autofagije u ćeliji značajan za degradaciju oštećenih i nefunkcionalnih proteina i organela (Kaur i Debnath, 2015; Hara, 2006).

Poznato je da je bazalna autofagija neophodna za pravilno funkcionisanje jetre. U uslovima gladovanja aktivacijom autofagije se ćelijama jetre obezbeđuju neophodni nutrijenti i energija koji su neophodni za preživljavanje do ponovnog uspostavljanja ravnoteže. Stoga se poremećaji u procesu autofagije često dovode u vezu sa različitim bolestima jetre ili kao uzrok ili kao posledica i neophodno je ispitati mehanizme koji leže u osnovi poremećenih procesa autofagije u jetri kako bi se sprečila ili zaustavila oštećenja ovog organa (Czaja i sar., 2013).



Slika 9. Uloga autofagije u ćelijskoj smrti i preživljavanju. U uslovima stresa, aktivirani su mnogobrojni ćelijski putevi koji mogu voditi smrti ili aktivaciji mehanizama koji omogućavaju preživljavanje kao što je autofagija. Ukoliko aktivirani odgovori na stres uspeju da uspostave homeostazu ćelija preživljava. Ukoliko je stres previše jak ćelija umire bez obzira na aktivaciju autofagije. Preuzeto i prilagođeno iz (Galluzzi i sar., 2008).

Autofagija se može podeliti na tri tipa: makroautofagiju, mikroautofagiju i šaperonima posredovanu autofagiju (Kaur i Debnath, 2015). Makroautofagija podrazumeva formiranje dvomembranskih vezikula - autofagozoma koji preuzimaju citoplazmatske proteine i organele zatim se transportuju do lizozoma i stapaju sa njima formirajući autofagolizosome, u kojima sadržaj biva degradovan od strane lizozomalnih proteaza (Kaur i Debnath, 2015; Mizushima i Komatsu, 2011). Mikroautofagija podrazumeva formiranje invaginacija lizozomalne membrane, što rezultuje u direktnom preuzimanju supstrata iz citoplazme koji bivaju degradovani lizozomalnim proteazama (Li i Bao, 2012). Šaperonima posredovana autofagija se razlikuje od prva dva tipa jer sadržaj nije degradovan u okviru vezikule. Umesto toga, proteini obeleženi za ovaj tip autofagije sadrže KFERQ slični pentapeptidni motiv koji je prepoznat od strane citoplazmatskih šaperona – proteina toplotnog šoka HSP70 (eng. heat shock protein). HSP70 promoviše translokaciju obeleženih proteina preko lizozomalne membrane u lumen lizozoma pomoću lizozomskog membranskog proteina (LAMP2A) receptora 8 (Cuervo i Wong, 2014). Kako je makroautofagija najčešće prisutan i najviše ispitan tip pod pojmom autofagija će se u daljem tekstu smatrati makroautofagija.



Slika 10. Tri tipa autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i šaperonima posredovana autofagija. Makroautofagija podrazumeva formiranje dvomembranske vezikule-autofagozoma u kome se nalazi ćelijski sadržaj za degradaciju. Mikroautofagija podrazumeva direktno unošenje ćelijskog sadržaja u lizosome. Šaperonima posredovana autofagija podrazumeva transport proteina u lizosome posredstvom HSP70 i LAMP-2A proteina. Preuzeto i prilagođeno iz (Periyasamy-Thandavan i sar., 2009).

1.2.3.1. Molekularne osnove makroautofagije/autofagije

Najraniji korak makroautofagije odnosno autofagije, jeste odvajanje regiona citoplazme u dvomembranske vezikule koje se nazivaju autofagozomi. Autofagozomi se postepeno spajaju sa lizozomima, što dovodi do degradacije sadržaja ovih vezikula. (Xie i Klionsky, 2007; Lamb i sar., 2013) Formiranje autofagozoma uključuje tri osnovna koraka: nukleacija (formiranje izolovane membrane autofagozoma), elongacija (širenje i zatvaranje izolovane membrane sa obuhvaćenim ćelijskim sadržajem čime se formira autofagozom) i maturacija (spajanje autofagozoma sa lizozomima prilikom čega se formira autofagolizozom). Svi ovi procesi nalaze se pod strogom kontrolom Atg (engl. autophagy related) proteina (Xie i Klionsky, 2007; Lamb i sar., 2013; Yang i Klionsky, 2009).

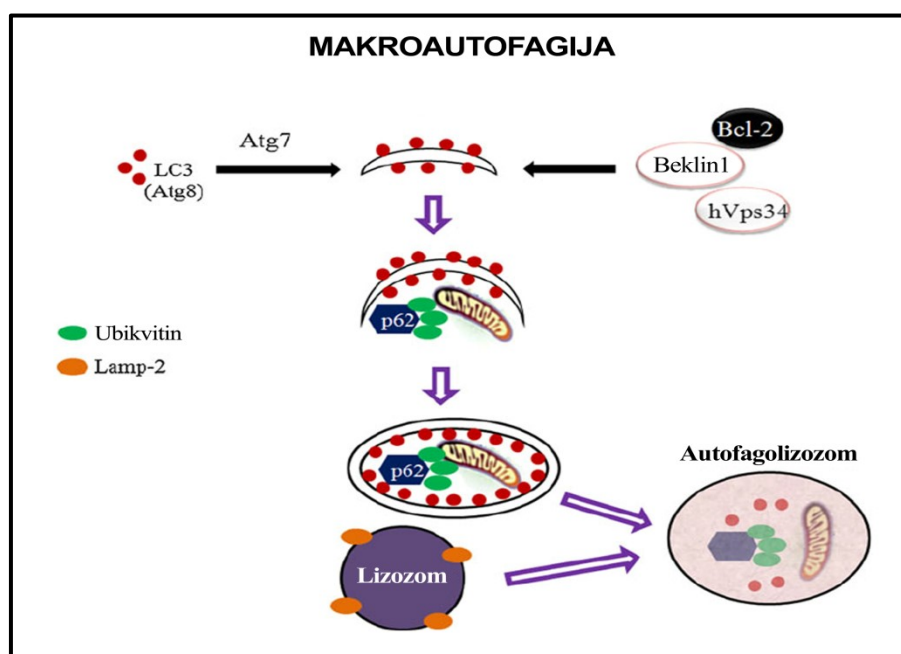
Proces autofagije započinje sa formiranjem izolovane membrane, ili fagofore koja najverovatnije nastaje od lipidnog dvosloja endoplazmatičnog retikuluma i/ili trans-Goldži aparata i endozoma (Lamb i sar., 2013; Axe i sar., 2008), iako tačno poreklo fagofore u ćelijama sisara nije utvrđeno. Nije isključeno da se može formirati i

de novo. Formirana fagofora se širi kako bi progutala ćelijski sadržaj, kao što su proteinski agregati ili cele organele, na taj način odvajajući ćelijski sadržaj za degradaciju. Kada se krajevi fagofore sa sadržajem spoje formira se autofagozom. (Axe i sar., 2008). Ispunjen autofagozom sazreva kroz fuziju sa lizozomom, usled čega dolazi do degradacije sadržaja autofagozoma od strane lizozomalnih proteaza katepsina B i D. Lizozomalne permeaze i transporteri izvoze amino kiseline i druge bio-produnkte degradacije nazad u citoplazmu gde mogu ponovo biti korišćeni za sintezu makromolekula i u procesima metabolizma (Kaur i Debnath, 2015; Mizushima, 2007).

Formiranje fagofore zahteva klasu III fosfatidilinozitol 3-kinaza. Najbolje opisana kinaza iz ove klase je Vps34 (eng. vacuolar protein sorting) kinaza koja učestvuje u mnogim procesima formiranja membrana unutar ćelije, a uključuje se u autofagiju preko interakcije sa regulatornim proteinom Beklin1 (Backer, 2008). Vps34 koristi samo fosfatidilinozitol kao supstrat da formira fosfatidil inozitol trifosfat neophodan za elongaciju fagofore i regrutovanja drugih Atg proteina u procesu formiranja autofagozoma (Xie i Klionsky, 2007; Backer, 2008). Interakcija Vps34 sa Beklin1 promovise katalitičku aktivnost ove kinaze i uvećanje nivoa fosfatidil inozitol trifosfata. Vps34 kinaza i Beklin1 interakcija je uslovljena signalima kao što su dostupnost nutrijenata u mikrookolini. Kontrola aktivnosti Vps34 kinaze jeste interakcija Beklin1 sa Bcl-2 proteinom koja inhibira formiranje veze Beklin1 sa Vps34 kinazom (Pattingre i sar., 2005). Interakcija Beklin1 sa inhibitornim Bcl-2 omogućena je preko BH3 domena Beklin1 proteina (Pattingre i sar., 2005; Maiuri i sar., 2007a). Stoga Bcl-2 igra dvostruku ulogu u određivanju sudbine ćelije u zavisnosti od lokalizacije: ima ulogu u preživljavanju jer na mitohondrijama sprečava izlazak citohroma C i posledično apoptozu i, u citoplazmi, interakcijom sa Beklin1 inhibira aktivaciju autofagije (Pattingre i sar., 2005).

Drugi ubikvitinu sličan sistem koji učestvuje u formiranju autofagozoma jeste mikrotubularni pridruženi protein lakog lanca 3 (eng. microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3) čija je sinteza i procesovanje povišeno u autofagiji čineći ga jednim od glavnih markera ovog procesa. LC3 je prisutan u gotovo svim ćelijama kao citoplazmatski protein koji se prilikom aktivacije autofagije proteolitički seče i obrađuje od strane cistein proteaza Atg4 i Atg7 i formira se aktivna LC3-I forma ovog proteina. Zatim se ova forma konjuguje sa fosfatidiletanolaminom u LC3-II formu što katalizuje

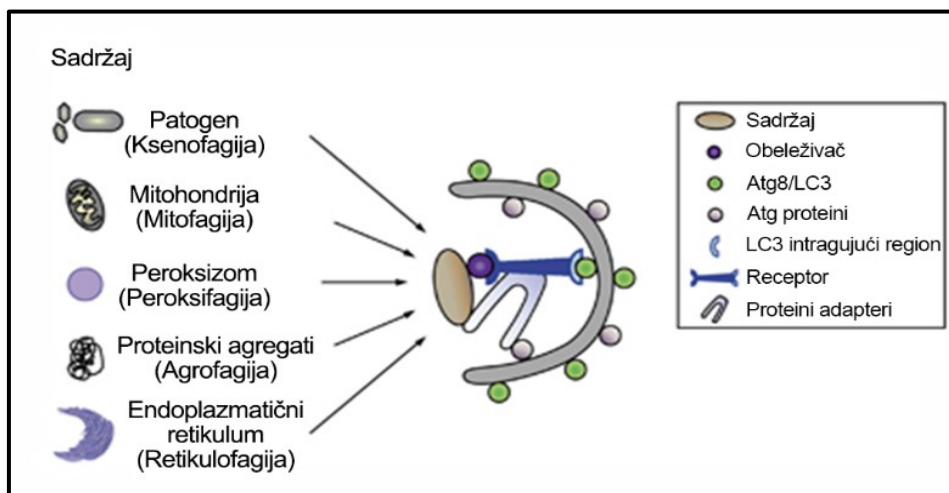
Atg3 protein. Formiran LC3-II se zatim regrutuje i inkorporira u fagoforu (Kaur i Debnath, 2015; Barth i sar., 2010). Na LC3-II protein inkorporiran u membranu autofagozoma, se zatim vezuje p62 protein (poznat još i kao sekvestrom 1) preko LC3 interagujućeg regiona (Tang i sar., 2010a). Sa druge strane p62 protein se vezuje kao obeleživač za one proteine ili organele koji su selektovani da se degraduju u procesu autofagije pa je u njegovom nivou pokazatelj stepena aktivnosti autofagije u ćeliji (Mizushima i Klionsky, 2007; Tang i sar., 2010b; Bjorkoy i sar., 2009).



Slika 11. Uloge Atg proteina u formiranju autofagozoma i funkciji lizozoma. Preuzeto i prilagođeno iz (Liu i sar., 2013).

1.2.3.2. Selektivni oblici autofagije

Autofagija se najčešće posmatra kao neselektivni proces degradacije. Međutim, pored neselektivne, nekoliko formi selektivne autofagije su identifikovane kao učesnici u uklanjanju oštećenih organela i označene su kao retikulo-fagija (uklanjanje endoplazmatskog retikuluma), peroksifagija (uklanjanje peroksizoma), mitofagija (uklanjanje mitohondrija), ribofagija (uklanjanje ribozoma). Selektivna autofagija nije ograničena samo na degradaciju organela. Lipidi (makrolipofagija), glikogen i patogeni (ksenofagija) se takođe selektivno degraduju autofagijom (Reggiori i sar., 2012).



Slika 12. Selektivni oblici autofagije. Tip selektivne autofagije zavisi od receptora i adaptornih proteina koji obeležavaju odgovarajući sadržaj za degradaciju u autofagozomima jer povezuju sadržaj sa Atg proteinima. Preuzeto i prilagođeno iz (Isakson i sar., 2013).

Mitohondrije su dinamične organele koje konstanto ulaze u procese fuzije i fisije. Ova dva suprotna procesa su neophodna za održavanje oblika, veličine i broja mitohondrija kao i njihove fiziološke funkcije. Fuzija omogućava mešanje sadržaja dve bliske organele. Fisija omogućava distribuciju mitohondrija ćerkama ćelijama nakon mitoze i takođe predstavlja kontrolni mehanizam kada oštećene mitohondrije trebaju biti ukonjenje selektivnom autofagijom. (Chan, 2012). Kako mitohondrijalna DNK ne poseduje histone podložnija je 10 do 20 puta mutacijama od jedarne DNK a (Chan, 2012; Yakes i Van, 1997). Oksidativni stres dovodi do mitohondrijalnog oštećenja i disfunkcije čime takve mitohondrije bespotrebno hidrolizuju ATP, i takođe same postaju izvor uvećane produkcije ROS i dovode do aktivacije apoptoze oslobađanjem pro-apototskih proteina u citoplazmu kao i do nekroze. Eliminacija ovako oštećenih mitohondrija je ključna u zaštiti ćelije od posledica oksidativnog stresa (Yakes i Van, 1997)

Blagi oksidativni stres selektivno aktivira mitofagiju kako bi se uklonio višak formiranih kiseoničnih radikala uz odsudstvo neselektivnog procesa autofagije. (Kiffin 2006; Frank i sar., 2012). Međutim u uslovima intenzivnog oksidativnog stresa dolazi do snažne oksidacije proteina i drugih ćelijskih komponenti koji aktiviraju i selektivnu i neselektivnu autofagiju. Nagomilavanje oksidovanog sadržaja u citoplazmi ili u samim lizozomima koji su se spojili sa autofagozomima dovodi do usporavanja u uklanjanju

ovih komponenti. Prisustvo oksidovanog sadržaja u velikim količinama u lizozomima dovodi do produkcije ROS koji narušavaju integritet lizosomalne membrane što dovodi do pucanja ovih organela, curenja lizosomalnih proteaza u citoplazmu što dovodi do ćelijskog oštećenja i ćelijske smrti (Kiffin 2006).

1.2.3.3. Pozitivna i negativna uloga autofagije u uslovima oksidativnog stresa

Autofagija se generalno definiše kao mehanizam koji ćeliji omogućava preživljavanje u uslovima različitih tipova stresa. Ukoliko dođe do intenzivne aktivacije ovog procesa nastupa ćelijska smrt koja se detektuje kroz veliki broj formiranih autofagozoma uz odsustvo kondenzacije hromatina. Iako je deregulacija autofagije predložena kao jedan od procesa koji doprinosi napretku pojedinih bolesti, najveći broj istraživanja potvrđuje protektivnu ulogu autofagije (Shen i sar., 2012). Aktivacija autofagije u uslovima oksidativnog stresa može biti dvojaka: može intezivirati ćelijsku povredu i dovesti do smrti ili poslužiti kao citoprotektivni mehanizam koji uklanja oštećene organele koje postaju izvor ROS, pa pored već postojećih, može predstavljati još jedan vid antioksidativne odbrane ćelije (Shen i sar., 2012; Rosenfeldt i Ryan, 2011)

Ćelijska smrt posredovana aktivacijom autofagije tokom stanja u kojima preovlađuje oksidativni stres, nastaje kao posledica preterane degradacije ćelijskih komponenti koje su neophodne za normalno funkcionisanje ćelije. Takođe, permeabilizacija membrane lizozoma, koja se dešava usled snažne aktivacije autofagije i unosa oksidovanog sadržaja u lizosome, dovodi do pucanja ovih organela, oslobađanja ROS i lizosomalnih proteaza u citoplazmu i, posledično, do ćelijske smrti (Kiffin 2006; Kagedal i sar., 2001). Tako npr. infekcija sa *Mycobacterium tuberculosis* dovodi do ćelijske smrti makrofaga usled aktivacije autofagije izazvane uvećanom produkcijom ROS od strane oštećenih mitohondrija (Shin i sar., 2010). Inhibicijom ekspresije gena za *Beklin1*, čime se onemogućilo formiranje autofagozoma, poboljšalo se preživljavanje ovih ćelija. Odumiranje dopaminergičkih neurona postignuto inhibiranjem mitohondrijalnog transportnog lanca različitim agensima dovelo je do uvećane produkcije ROS i do aktivacije autofagije. Kako je propadanje ovih ćelija karakteristično za Parkinsonovu bolest pretpostavlja se da u osnovi ovog poremećaja

leži ćelijska smrt autofagijom. Slično, dodavanje H_2O_2 u ćelijsku kulturu dopaminergičnih neurona dovelo je do ćelijske smrti usled aktivacije autofagije. (Castino i sar., 2011; Choi i sar., 2010)

Sa druge strane, pokazana je i protektivna uloga ovog procesa u uslovima oksidativnog stresa. U U251 ćelijama ljudskih glioma, pokazano je da H_2O_2 aktivira autofagiju, što je praćeno povećanom ekspresijom Beclin1 proteina i inhibicijom signalnog puta mTOR (eng. mammalian target of rapamycin) proteina što je omogućavalo preživljavanje ovih ćelija, dok je blokiranje delovanja H_2O_2 stimulisalo apoptozu. Takođe zabeležena je i protektivna uloga autofagije tokom starenja gde dolazi do uvećane mitohondrijalne disfunkcije u mnogim tipovima ćelija. Kod starih pacova ćelijska smrt kardiocita i neurona izazvana uvećanim formiranjem mitohondrijalnog ROS umanjena je aktivacijom mitofagije (Li i sar., 2013). Inhibicijom autofagije različitim farmakološkim agensima došlo je do pojačanog odumiranja ovih ćelija. Istraživanja su pokazala da i tokom gladovanja, aktivirana autofagija obezbeđuje ćeliji neophodne nutrijente direktno razgradnjom ćelijskih komponenti i da gladovanjem aktivirana autofagija zavisi od stepena formiranja mitohondrijalnog $O_2^{\cdot-}$. (Chen i sar., 2011). Formiranje ROS tokom ishemije reperfuzije omogućava preživljavanje ćelija jetre aktivacijom autofagije, čijom inhibicijom se aktivira apoptotska ćelijska smrt. (Bhagal i sar., 2012).

Uloga autofagije u ćeliji u uslovima oksidativnog stresa je i dalje poprilično nerazjašnjena. Da li će autofagija dovesti do ćelijske smrti ili omogućiti preživljavanje ćelije u mnogome zavisi od tipa ćelije, stepena oksidativnog stresa, ali i od stepena aktivacije i selektivnosti procesa autofagije (Kiffin 2006; Filomeni i sar., 2015). Zato je od velikog interesa upoznati mehanizme koji regulišu dualnu prirodu autofagije i čijom modulacijom bi se menjao krajnji ishod ovog procesa.

1.2.3.4. Povezanost apoptoze i autofagije

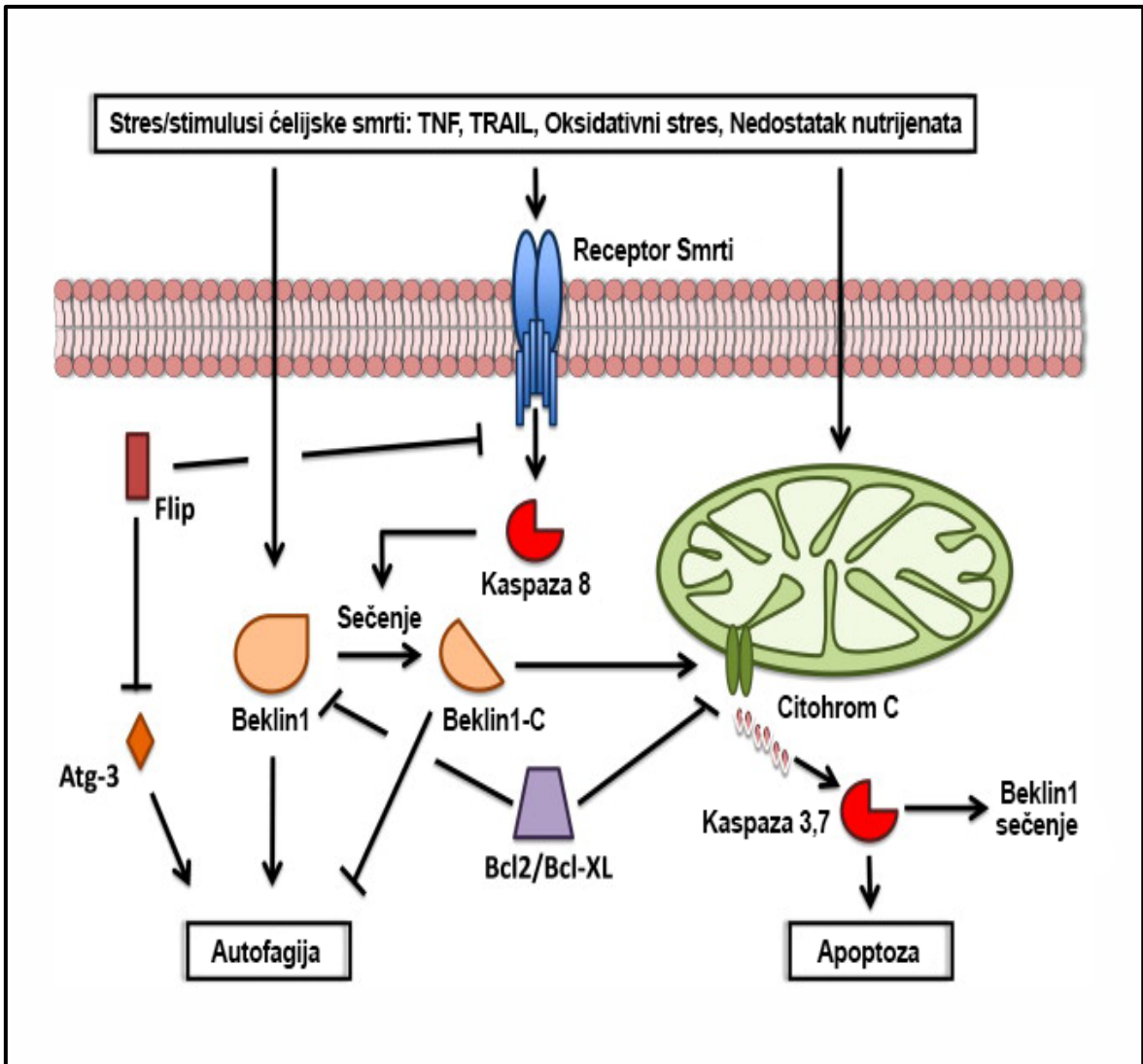
Veza između apoptoze i autofagije je vrlo kompleksa jer u zavisnosti od tipa stresogenog stimulusa i energetskeg statusa ćelije autofagija može doprinosti adaptaciji i ćelijskom preživljavanju i na taj način sprečiti apoptozu dok sa druge strane može zajedno sa aktiviranom apoptozom dovesti do ćelijske smrti (Baehrecke, 2005). Generalno, slični stimulusi mogu aktivirati i apoptozu i autofagiju ali priroda njihovog odnosa kao i prevaga između ova dva procesa zavisi od ispitivanog modela sistema. Otkriveno je nekoliko signalnih puteva koji su ispitani na molekularnom nivou a koji povezuju apoptozu i autofagiju (Maiuri i sar., 2007b). Ulogu ključnog regulatora veze između apoptoze i autofagije ima Beklin1 protein (Kang i sar., 2011). U bazičnim uslovima aktivnost Beklin1 proteina u inicijaciji autofagije je inhibirana interakcijom preko BH3 domena ovog proteina sa anti-apoptotskim Bcl-2 proteinom. Raskidanje ove veze je esecijalno za aktivaciju autofagije i može se odigrati preko nekoliko mehanizama: kompeticijom za BH3 vezivno mesto Beklin1 proteina između anti-apoptotskog Bcl-2 proteina i pro-apoptotskog Bad proteina (Sinha i Levine, 2008), što govori u prilog tome da stimulusi koji aktiviraju apoptozu dovode i do aktivacije autofagije. Drugi mehanizam raskidanja Bcl-2/Beklin1 kompleksa jeste fosforilacija Bcl-2 proteina posredovana ERK (eng. extracellular signal-regulated kinase) kinazom, kao odgovor na smanjenje dostupnosti nutrijenata ili prisustva oksidativnog stresa, čime je omogućeno otpočinjanje procesa autofagije kao adaptivnog mehanizma (Tang i sar., 2010a). Treći mehanizam jeste kompeticija za BH3 vezivno mesto između Bcl-2 proteina i drugih Beklin1 vezujućih proteina prisutnih u citoplazmi ćelije (UVRAG, (eng. UV radiation resistance associated gene protein); Atg14/Barkor; HMGB1). Interakcijom sa ovim proteinima potencira se anti-apoptotsko stanje u ćeliji i aktivacija autofagije kao citoprotektivnog mehanizma (Kang i sar., 2010; Liang i sar., 2006;). Takođe, formiranje homooligomera Beklin1 proteina može dovesti do disocijacije Bcl-2 proteina i otpočinjanja procesa autofagije (Kang i sar., 2010). Pored Bcl-2 proteina inhibitorno dejstvo na aktivnost Beklin1 proteina ima i Bcl-XL.

U uslovima kada je ćelijski stres takav da se prevazilaze citoprotektivni mehanizmi ćelije, dolazi do aktivacije apoptoze. Da bi se proces apoptoze nesmetano odvijao čime bi se izbegla nekrotska smrt i pojava inflamacije neophodno je da dođe do inhibicije autofagije što je postignuto proteolitičkim sečenjem Beklin1 proteina od

strane efektorskih kaspaza. Wirwan i saradnici (2010) su pokazali da kaspaze 3, 7 i 8 proteolitički seku Beklin1 na dva mesta nizvodno od BH3 domena, čime se formiraju fragmenti od 37 i 35 kDa (C terminalni fragmenti Beklin1 proteina). Ista grupa je ukazala na to da formirani fragmenti Beklin1 proteina ne pokazuju sposobnost inicijacije autofagije ali zato pojačavaju apoptotski signal jer se translociraju na mitohondrije i dovode do oslobađanja pro-apoptotskih faktora u citoplazmu. Mutacijom vezivnih mesta za efektorne kaspaze i izostanka sečenja Beklin1 proteina dovelo je do nesmetanog odigravanja procesa autofagije bez obzira na aktivirane apoptotske mehanizme u ćeliji (Siddiqui i sar., 2015). što potvrđuje tvrdnju da je Beklin1 ključni protein koji povezuje procese apoptoze i autofagije.

Autofagija u određenim uslovima može delovati u sadejstvu sa apoptozom. Ćelijska smrt u izmenjenim v-Ha-ras ćelijama postignuta je sa oba procesa. (Eum i Lee, 2011). Primenom inhibitora apoptoze FLIP (eng. flice inhibitory protein) koji sprečava prenos apoptotskog signala sa receptora smrti dolazi i do izostanka aktivacije autofagije usled kompeticije FLIP-a sa LC3 proteinom za interakciju sa Atg3 proteinom čime se narušava elongacija autofagozoma što poboljšava preživljavanje v-Ha-ras ćelija. (Lee i sar., 2009). Ovi podaci govore u prilog tome da autofagija može i doprinosti ćelijskoj smrti posredovanoj apoptozom .

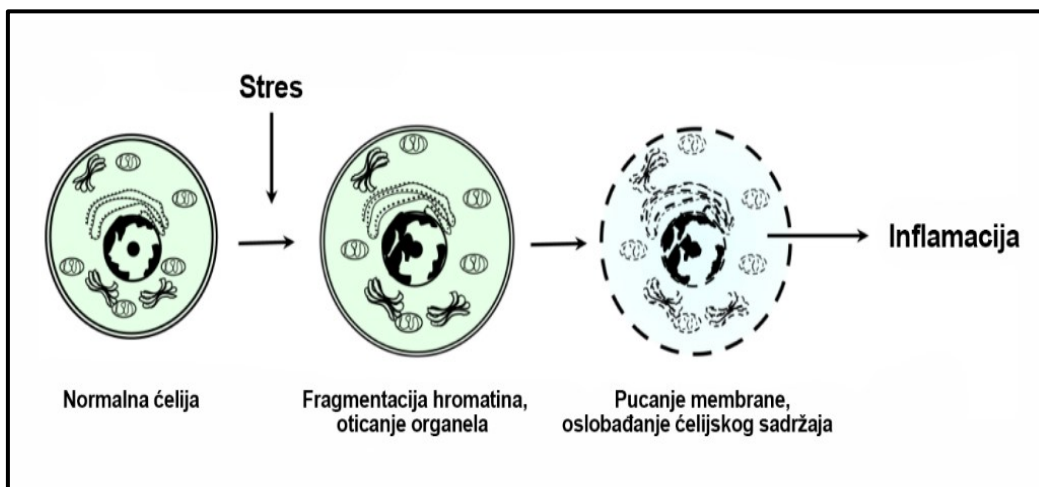
Van svake sumnje, iako se radi o dva različita molekularna mehanizma, postoje mnogobrojne veze između procesa apoptoze i autofagije. Vrlo često se u uslovima ćelijskog stresa autofagija aktivira pre apoptoze. Ranija aktivacija autofagije može imati dva suprotna cilja. Sa jedne strane, autofagija omogućava ćelijsko preživljavanje kroz obezbeđivanje neophodne energije degradacijom ćelijskih komponenti čime se sprečava ili odlaže aktivacija apoptoze. Sa druge strane, u određenim uslovima autofagija služi da održi optimalan nivo ATP-a u ćeliji kako bi se proces apoptoze nesmetano odigrao čime doprinosi ćelijskoj smrti. (Maiuri i sar., 2007b). Veza između ova dva fundamentalna ćelijska procesa nije jednostavna i u mnogome zavisi od tipa ćelije i stresa kome je ćelija izložena.



Slika 13. Molekularna povezanost apoptoze i autofagije. Beklin1 predstavlja ključnu tačku ukrštanja procesa apoptoze i autofagije. Sečenje Beklin1 proteina od strane aktiviranih kaspaza dovodi do inhibicije autofagije i pojačavanja signala apoptoze preko formiranog Beklin1-C fragmenta. Bcl-2/Bcl-XL se ponašaju kao inhibitori i apoptoze i autofagije. Preuzeto i prilagođeno iz (Amelio i sar., 2011).

1.2.4. Molekularna osnova nekroze

Nekroza se javlja kao posledica nefizioloških stimulusa kao što su mehanička oštećenja, toksini ili virusi i hipoksija, na koje ćelija nije u stanju da odgovori i dolazi do ćelijske smrti. Ono što razlikuje nekrozu od apoptoze i autofagije je veoma brz gubitak potencijala ćelijskih membrana, ili usled oštećenja ili usled promene funkcije jonskih pumpi i kanala, što dovodi do bubrenja organela i same ćelije i što za posledicu ima pucanje ćelijske membrane i izlivanje ćelijskog sadržaja u vanćelijsku sredinu.



Slika 14. Morfološke odlike nekroze. Preuzeto i prilagođeno iz (Escobar i sar., 2015).

Nekroza se definiše kao pasivan proces koji je rezultat metaboličke katastrofe koji se ogleda u brzom gubitku ATP-a (Zong i Thompson, 2006) i tumači se u negativnom maniru jer je praćena inflamacijom. Razlikuje se nekoliko ključnih faktora u ćeliji koji posreduju u nekrotskoj smrti i označeni su kao medijatori nekroze.

1.2.4.1. Pad energetskeg nivoa kao medijator nekroze

U ćelijama do nekrotske smrti može doći usled inhibicije mitohondrijalnog respiratornog lanca (elektron transportnog lanca). Gubitak transmembranskog potencijala unutrašnje membrane mitohondrija dovodi do nestanka protonskog gradijenta i otvaranja mitohondrijalne permeabilizacione pore. Dokle god su pore otvorene, ćelija ne sintetiše ATP u procesu oksidativne fosforilacije. Usled nedostatka ATP-a, ćelije koje se brzo dele nedostatak ATP-a nadoknađuju glikolizom, ali inhibicija

glikolize dovodi do potpunog energetskeg kolapsa i do ćelijske smrti nekrozom (Ohgoh i sar., 2000). Uvećana aktivacija PARP-1 proteina je jedan od mehanizama preko koga se inhibira glikoliza jer njegova preterana aktivnost dovodi do naglog pada u koncentraciji NAD^+ , koji je kofaktor i u procesu glikolize i u procesu oksidativne fosforilacije koji obezbeđuje ATP. Uvećana aktivnost PARP-1 proteina ima za posledicu smanjenu produkciju ATP-a, a kao krajnja posledica je energetska katastrofa u ćeliji i nekrotska smrt (Baggetto, 1992). Kod ćelija koje su podlegle nekrozi, PARP-1 pokazuje specifičan obrazac degradacije na fragmente od 55 i 62 kDa (Baggetto, 1992; Ha i Snyder, 1999).

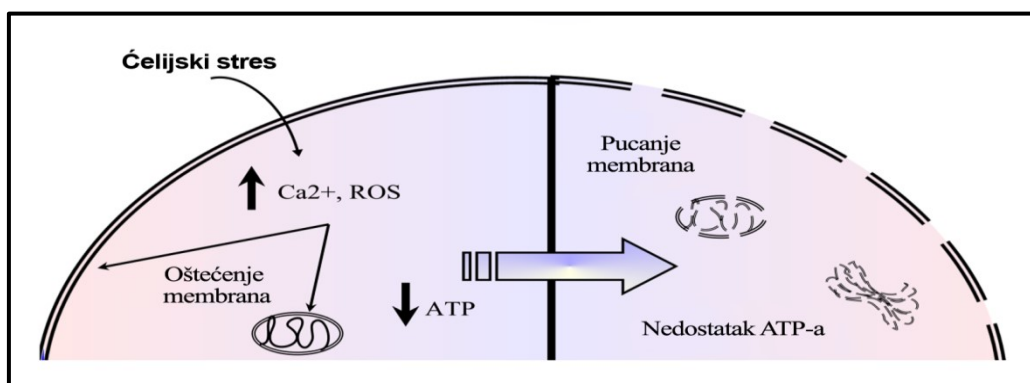
1.2.4.2. Joni kalcijuma kao medijatori nekroze

Uvećan nivo jona kalcijuma (Ca^{2+}) u citoplazmi predstavlja jedan od centralnih događaja u nekrozi. Ca^{2+} aktivira proteaze koje degraduju neophodne proteine za održavanje vijabilnosti ćelije. U normalnim fiziološkim uslovima većina Ca^{2+} je deponovana u endoplazmatičnom retikulumu. Promena u nivou Ca^{2+} u citoplazmi se dešava tokom oksidativnog stresa (Li i sar., 2010). Kada poraste koncentracija ovog jona u citoplazmi, bilo usled oslobađanja iz endoplazmatičnog retikuluma, bilo ulaskom kroz ćelijsku membranu, dolazi do pokretanja nekoliko procesa zavisnih od prisustva Ca^{2+} od kojih svaki može dovesti do nekroze (Xu i sar., 2001). Porast u koncentraciji Ca^{2+} aktivira Ca^{2+} zavisne proteaze koje degradiranjem ciljnih proteina dovode do nekroze (Xuet i sar., 2001; Artal-Sanz i Tavernarkis, 2005). Takav enzim je kalpain koji se u neaktivnoj formi nalazi u citoplazmi. Usled povećanja koncentracije Ca^{2+} dolazi do translokacije na membrane organela i autokatalitičke aktivacije ovog enzima hidrolizom (Zong i Thompson, 2006). Supstrati kalpaina su proteini citoskeleta, membranski proteini, proteini jonskih pumpi i kanala, kinaze, fosfataze i fosfolipaze (Rami, 2003). Na primer, kalpain degradira proteinski deo natrijum-kalcijumove pumpe, koja izbacuje suvišni Ca^{2+} iz ćelije. Inhibicijom rada ove pumpe dolazi do neprestanog porasta Ca^{2+} u citoplazmi (Bano i sar., 2005). Takođe, pokazano je da se aktivirani kalpain translocira na lizosome i ima značajan uticaj na promenu permeabilnosti lizosomalne membrane (Yamashima, 2000). Promena u permeabilnosti lizozomske membrane dovodi do oslobađanja katepsina koji predstavljaju aspartil-, serin-, i cistein- proteaze koje u

uslovima homeostaze učestvuju u razgradnji fagocitiranog sadržaja (Rawlings i Barrett, 1999). Kada se nađu u citosolu katepsini dolaze u kontakt sa proteinima koji inače ne predstavljaju njihove supstrate i degradiraju ih što dovodi do nekroze ćelije. Ovo je poznato kao „kalpain-katepsin“ hipoteza (Syntichaki i Tavernarakis, 2002).

1.2.4.3. Slobodni radikali kao medijatori nekroze

Već je rečeno da tokom oksidativnog stresa, ROS dovode do DNK oštećenja. Kao odgovor na ova oštećenja može doći do hiperaktivacije PARP-1 proteina što može dovesti do nekroze kako je već objašnjeno u tekstu gde se kao medijator nekroze navodi energetski kolaps u ćeliji (Ha i Snyder, 1999; Bouchard, 2003). Takođe, ROS dovodi i do oksidacije lipida što rezultuje u gubitku integriteta plazma membrane i ostalih unutarćelijskih membrana. Oštećenja plazma membrane lizozoma i endoplazmatskog retikuluma dovode do oslobađanja lizozomalnih proteaza i povećanja u nivou citosolnog Ca^{2+} , koji predstavlja medijator nekroze i dovodi do aktivacije kalpaina (Vanlangenakker i sar., 2008) Ovo čini ROS kako uzrokom tako i vezom između različitih mehanizama koji rezultuju nekrozom ćelije.



Slika 15. Medijatori nekroze. Nivo ROS i unutarćelijskog Ca^{2+} su uvećani u nekrotskoj ćeliji što ima za posledicu izmenjenu propustljivost ćelijske membrane koje dovodi do oštećenja i pucanja ćelije. Preuzeto i prilagođeno iz (Escobar i sar., 2015).

1.2.4.4. Programirana nekroza

Podjela ćelijske smrti na programiranu i neprogramiranu podrazumeva jasno razdvajanje aktivnog, energetski zavisnog procesa kao što su apoptoza i autofagija, od pasivnog načina ćelijske smrti sa nekrotskom morfologijom. Međutim sve je više podataka u današnjoj literaturi gde se pominje termin programirana ili regulisana nekroza koji se odvija po određenom obrascu (Fink i Cookson, 2005).

Nekroza može biti pokrenuta aktivacijom određenih receptora na površini ćelije, poput TNF α receptora (Laster i sar., 1988), koji dovodi do aktivacije molekularnih mehanizama uključenih u procese regulisane nekroze. Pronalazak unutarćelijskih serpina, proteaznih inhibitora koji mogu da zaustave nekrozu izazvanu različitim stimulusima, govori u korist tome da nekroza može biti regulisan, programiran proces, aktiviran kao odgovor na stres (Luke i sar., 2007 Sun i sar., 2012). Jedan od ključnih događaja u regulisanoj nekrozi jeste otvaranje tranzicione mitohondrijalne permeabilizacione pore (eng. mitochondrial permeability transition pore, MPTP). Pokazano je da je mitohondrijalni protein ciklofilin D zajedno sa translokatorom za adenin nukleotide i nosačima fosfata uključan u otvaranje MPTP i pokretanje regulisane nekroze (Berghe i sar., 2014). Međutim za aktivnost ciklofilina D neophodno je da dođe do interakcije sa p53 proteinom koji se na odgovarajući signal translocira u mitohondrije. Ova interakcija dovodi do otvaranja MPTP što dovodi do gubitka membranskog potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, zaustavljanja sinteze ATP-a i uvećane produkcije ROS. Uvećana produkcija ROS dalje aktivira ćelijske mehanizme kao što je aktivacija PARP-1 proteina koja dovodi do energetskog kolapsa i ćelijske smrti nekrozom. Na primer, mehanizam koji uključuje p53, ciklofilin D i PARP-1 protein dovodi do aktivacije regulisane nekroze koja je zabeležena u akutnoj povredi bubrega (Sun i sar., 2012). Neki od primera regulisane nekroze su nekroptoza, partanatos, piroptoza, paraptoza (Berghe i sar., 2014).

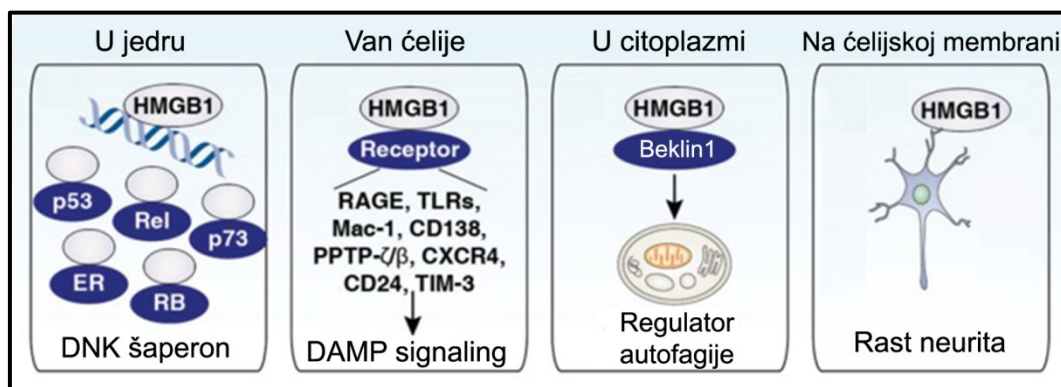
Bez obzira da li se radi o slučajnoj ili regulisanoj nekrozi, poznato je da kada dođe do nekroze ćelije, u vanćelijsku sredinu se oslobađaju takozvani molekularni markeri povezani sa oštećenjem (eng. damage-associated molecular-pattern molekulu, DAMP ili alarmini koji imaju proinflamatornu ulogu. DAMP molekuli mogu biti DNK, RNK kao i različiti unutarćelijski proteini koji su eksprimirani u različitim tipovima

ćelija i imaju različite funkcije u homeostazi ćelije. Neki od DAMP molekula su locirani i u jedru i u citoplazmi (HMGB1 proteini), samo u citoplazmi (S100 proteini), egzozomima (proteini toplotnog šoka) kao i u vanćelijskom matriksu (hijaluronska kiselina). Na osnovu porekla i mehanizma delovanja, proinflamatorni DAMP molekuli se dele na one koje dodatno formiraju DAMP molekule od drugih vanćelijskih molekula i na one koji direktno stimulišu ćelije imunskog sistema (Lotze i Tracey, 2005; Rock i Kono, 2008). Stoga, prve ćelije koje odumiru nekrozom usled traume ili infekcije zapravo funkcionišu kao senzori koji upozoravaju organizam da je neophodna aktivacija odbrambenih ili reparativnih mehanizama. Ali uloga DAMP molekula može biti dvojaka u zavisnosti od stepena oštećenja. Na primer jedan od najviše ispitivanih DAMP molekula, HMGB1 protein, u uslovima slabijih oštećenja ima ulogu u aktivaciji imunskog odgovora koji vodi tkivnoj regeneraciji dok u slučaju većih oštećenja HMGB1 dovodi do intenzivnog inflamatornog odgovora koji vodi ćelijskoj smrti (Rosin i Okusa, 2011).

1.3. HMGB1 protein

Pre više od četrdeset godina (1973), otkrivena je grupa proteina koja je zbog svoje mobilnosti u elektroforetskim poliakrilamidnim gelovima nazvana proteini visoke mobilnosti ili HMG proteini (eng. high mobility group) (Goodwin i sar., 1973). Familiju HMG proteina čine tri subfamilije – HMGA, HMGB i HMGN. HMG proteini primarno predstavljaju strukturne komponente specifičnih regiona hromatina unutar kojih se ponašaju kao arhitekturni transkripcioni faktori koji regulišu genomsku stabilnost kroz interakcije sa nukleotidima, histonima, regulatornim proteinima transkripcije i drugim hromozomalnim i jedarnim proteinima, i stvaranjem stereospecifičnih proteinskih kompleksa direktno ili indirektno učestvuju u regulaciji replikacije i transkripcije gena. Među HMG proteinima posebnu pažnju privlači član HMGB subfamilije – HMGB1 protein (eng. High mobility group box 1), poznat i kao HMG-1, amfoterin ili p30 (Rajeswari i Jain, 2002). HMGB1 je postao predmet mnogih istraživanja od kako je 1996. god. utvrđeno i njegovo vanćelijsko prisustvo i uloge drugačije od onih unutar ćelije. HMGB1 je prisutan u različitim tkivima i njegovo najveće prisustvo je detektovano u slezini i timusu, a potom u jetri i mozgu. Nivo HMGB1 se uvećava u

kanceru ali smanjuje tokom starenja (Kang i sar., 2013b). Neophodan je za život jer miševi koji nemaju gen za HMGB1 ubrzo po rođenju umiru usled defekta u regulaciji transkripcije gena glukokortikoidnim receptorom i nemogućnosti da koriste glikogen iz jetre (Calogero i sar., 1990). Takođe, uvećanjem nivoa HMGB1 proteina u srcu miševa transgenim metodama, značajno se uvećava preživljavanje i zaštita od infarkta (Kitahara i sar., 2008). Nedostatak ovog proteina u pankreasu, jetri i makrofagama čine miševe osetljivijim na pankreatitis (Kang i sar., 2013b), ishemiju jetre (Huang i sar., 2013) i sepsu (Yang i sar., 2010). Po svemu sudeći, spektar uloga ovog proteina i njegova neophodnost u brojnim biološkim procesima može da varira i da zavisi od tipa ćelije. Međutim, u svim ćelijama HMGB1 prelazi iz jedra u citoplazmu i obratno, i normalne ćelije ga uglavnom akumuliraju u jedru gde se vezuje za hromatin i ima ulogu DNK šaperona (Stros, 2010). HMGB1 protein je uključen u modifikaciju i stabilizaciju nukleozoma, regulaciju dužine telomera i održavanje hromozomalne stabilnosti. Pored uloge u remodelovanju hromatina, HMGB1 ima bitnu ulogu i u kontroli regulacije genske transkripcije, rekombinaciji i popravci DNK oštećenja. Ove uloge ostvaruje kroz interakcije sa DNK ili drugim proteinima poput proteina p53, p73 i glukokortikoidnog receptora (Bianchi i Beltrame, 2000).



Slika 16. Funkcije HMGB1 proteina. Preuzeto i prilagođeno iz (Chen i sar., 2013).

Subćelijska lokalizacija HMGB1 proteina, a time i njegove uloge, zavise od tipa ćelije, tkiva i prisustva stresogenih signala. Citoplazmatski HMGB1 vezuje mnoge proteine od kojih su neki uključeni u aktivaciju autofagije (Tang i sar., 2010a) ili progresiju kancera. Pojedine ćelije eksprimiraju HMGB1 u samom ćelijskoj membrani. Membranski HMGB1 kontroliše rast neurita, hemotaksiju glatke muskulature kao i

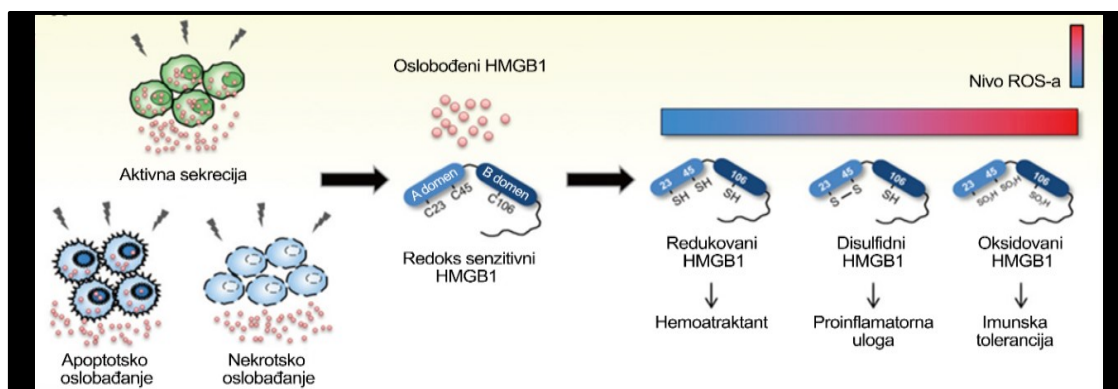
metastaze tumorskih ćelija jer je utvrđeno da je njegov nivo povišen u nediferenciranim ćelijama. HMGB1 može biti prisutan i u mitohondrijama (Tang i sar., 2011a; Bianchi i Manfredi, 2007).

U vanćelijskoj sredini HMGB1 se ponaša kao DAMP molekul i proinflamatorni citokin (Yang i sar., 2010; Tang i sar., 2010a). Vanćelijski HMGB1 interaguje sa nekoliko receptora preko kojih koordiniše različite ćelijske odgovore kao što je aktivacija imunog sistema, ćelijska migracija, ćelijski rast, angiogeneza, aktivacija mehanizama ćelijske smrti i preživljavanje, i popravka oštećenog tkiva i regeneracija (Erlandsson i Andersson, 2004). Vanćelijski HMGB1 može da formira heterokomplekse sa drugim koaktivatorima imunskog sistema kao što su interleukin 1 β , C-X-C motiv hemokin 12 (CXCL12), DNK, nukleozomi ili lipopolisaharidi (LPS) što dovodi do udruženog inflamatornog i imunološkog odgovora (Wahamaa i sar., 2011). Nekoliko istraživanja ukazuju da je prevelika vanćelijska akumulacija HMGB1 proteina citotoksična i da vodi ćelijskoj smrti apoptozom ili nekrozom, kao i tkivnim oštećenjima (Kikuchi i sar., 2009). Vanćelijski HMGB1 ispoljava i antibakterijsku aktivnosti kao i mitotičku. Ove vanćelijske aktivnosti HMGB1 proteina nisu posredovane njegovim interakcijama sa receptorima, već zavise od njegovog redoks stanja i strukture (Tang i sar., 2010b). Poznato je da HMGB1 ima tri cisteinska ostatka (C23, C45 i C106). Cys23/Cys45 u domenu A brzo formiraju intramolekulsku disulfidnu vezu u prisustvu ROS. C106 u domenu B je neophodan za HMGB1 jedarnu lokalizaciju jer mutacija na ovoj poziciji potencira izlazak HMGB1 iz jedra u citoplazmu. Redukovani HMGB1 ima snažniji afinitet vezivanja za DNK i prema Tangu i sar. (2011b) prisustvo ROS značajno smanjuje DNK vezujuće aktivnosti jedarnog HMGB1 i potencira prelazak HMGB1 u citoplazmu ćelija (Tang i sar., 2010b; Venereau i sar., 2012).

Pored oksidacije, subćelijsku i vanćelijsku lokalizaciju HMGB1 proteina određuju i druge posttranslacione modifikacije poput acetilacije, fosforilacije, glikozilacije i metilacije (Hoppe i sar., 2006). HMGB1 poseduje dva signalna motiva jedarne lokalizacije (eng. nuclear localisation signal, NLS) koja su odgovorna za kontrolisani transport ovog proteina u i iz jedra ćelija (Bonaldi i sar., 2003). Acetilacija i fosforilacija u okviru ova dva motiva su uključene u transport HMGB1 iz jedra u citoplazmu i vanćelijsku sredinu. Citoplazmatski HMGB1 se hiperacetiliše tokom aktivacije monocita i makrofaga LPS-om. Hiperacetilovanom HMGB1 je onemogućen

transport u jedro zbog čega se on pakuje u inflamazome i otpušta u vanćelijsku sredinu (Bonaldi i sar., 2003).

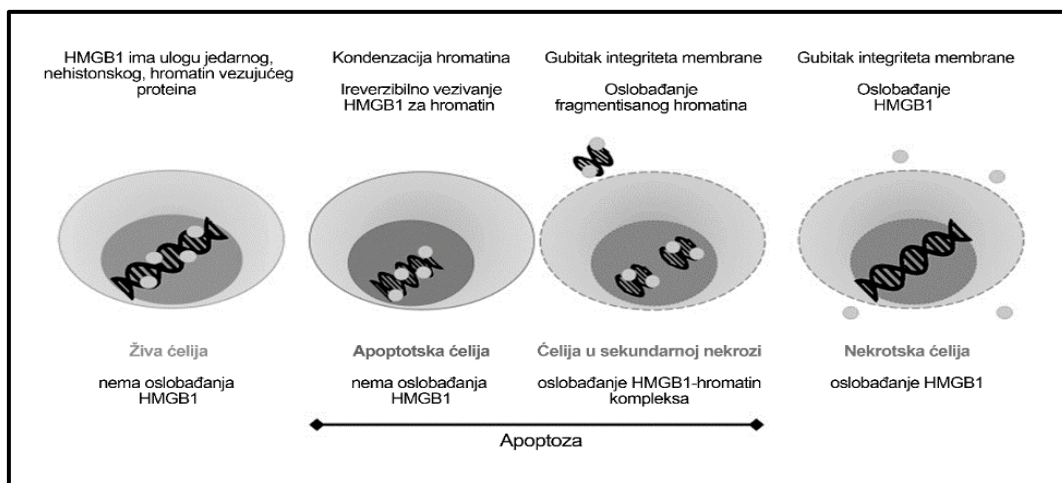
Novija istraživanja su pokazala da HMGB1 može biti N-glikozilovan na atomima azota (N) asparaginskih ostataka na poziciji 37 i 134 u okviru konsenzus sekvence NxSS/T. Ovakva modifikacija takođe ima bitnu ulogu u translokaciji HMGB1 proteina iz jedra u citoplazmu. (Kim i sar., 2016). HMGB1 može biti modifikovan i metilacijom. Metilacija menja konformaciju HMGB1 proteina i slabi afinitet ovog proteina ka DNK, što dovodi do toga da se translocira u citoplazmu putem pasivne difuzije iz jedra. (Ito i sar., 2007).



Slika 17. Uloge HMGB1 u zavisnosti od njegovog redoks stanja. Preuzeto i prilagođeno iz (Lee i sar., 2014).

1.3.1. Mehanizmi oslobađanja HMGB1 u vanćelijsku sredinu

HMGB1 se oslobađa u vanćelijsku sredinu pomoću dva mehanizma. Prvi je, pasivno oslobađanje iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija. U ovom slučaju, HMGB1 se ponaša kao unutarćelijski marker nekroze, alarmin ili DAMP molekul, odabran od strane urođenog imunskog sistema da ukazuje na prisustvo oštećenja tkiva i da pokreće reparativni odgovor (Scaffidi i sar., 2002).



Slika 18. Oslobađanje HMGB1 proteina u vanćelijsku sredinu. U živim ćelijama HMGB1 ima ulogu jedarnog, hromatin-vezujućeg proteina. Tokom apoptoze, HMGB1 se ireverzibilno vezuje za hromatin. Ako se apoptotske ćelije ne uklone na vreme od strane makrofaga, nastupa sekundarna nekroza i oslobađanje HMGB1 proteina u kompleksu sa nukleozomima. Tokom nekroze dolazi do pasivnog oslobađanja HMGB1 proteina u vanćelijsku sredinu. Preuzeto i prilagođeno iz (Janko i sar., 2014.).

Drugi mehanizam oslobađanja HMGB1 proteina u vanćelijsku sredinu je aktivna sekrecija iz imunskih ćelija (monocita, tkivnih makrofaga, enterocita, epitelijalnih ćelija, zrelih mijeloidnih i dendritskih ćelija). Ovako oslobođen HMGB1 deluje slično kao proinflamatorni citokini koji koordinišu inflamatorni odgovor na ishemiju, opekotinu, infekciju ili sepsu i iniciraju regeneraciju tkiva (Bonaldi i sar., 2003; Youn i Shin, 2006).

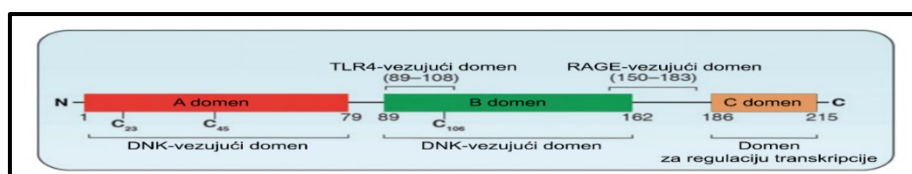
Kako HMGB1 ne poseduje vodeću (lider) signal sekvencu ne može biti otpušten standardnim endoplazmatični retikulum/Goldži sekretornim mehanizmom iz ćelije, već HMGB1 sekrecija iz makrofaga ili monocita zavisi od mogućnosti njegovog premeštanja iz jedra u specifične citoplazmatične organele, zvane inflamazomi (Vande Walle i sar., 2011). Da bi došlo do inicijalne faze otpuštanja HMGB1, potrebno je da do monocita dođe neki inflamatorni signal, bilo spoljašnji kao što su različiti PAMP (eng. pathogen associated molecular patterns) molekuli, poput endotoksina, ili unutrašnji, kao interferon γ , H_2O_2 , interleukin 1 ili $TNF\alpha$ (Wang i sar., 1999). Ovi signali će potom izazvati posttranslacione modifikacije (acetilaciju ili fosforilaciju) na odgovarajućim specifičnim aminokiselinskim ostacima HMGB1 proteina, što omogućava njegovu relokalizaciju iz jedra i akumulaciju u citoplazmi (Bonaldi i sar., 2003). Citoplazmatični HMGB1 biva preuzet od strane inflamazoma i oslobođen egzocitozom u vanćelijsku

sredinu (Vande Walle i sar., 2011). U slučaju ovakvog, regulisanog oslobađanja, imunske ćelije sekretuju posttranslaciono modifikovane forme HMGB1, koje se razlikuju od predominantno neizmenjenog HMGB1 proteina poreklom iz nekrotičnih ćelija. Međutim, novije studije su pokazale da pored imunskih i neke neimunske ćelije mogu aktivno oslobađati HMGB1 protein. Na primer u *in vitro* studijama je pokazano da parenhimske ćelije jetre, kada su izložene stresu oslobađaju acetilisani HMGB1 u vanćelijsku sredinu, što je pokazatelj njegove aktivne sekrecije (Evankovich i sar., 2010).

Dugo se smatralo da HMGB1 može biti oslobođen iz nekrotičnih ali ne i iz apoptotskih ćelija, jer se tokom apoptoze HMGB1 čvrsto vezuje za hromatin (Scaffidi i sar., 2002). Novije studije ipak ukazuju na to da apoptotske ćelije takođe oslobađaju HMGB1 u kasnim fazama apoptoze (faza koja se naziva i sekundarna nekroza) usled raspada apoptotskih tela koje nisu preuzeta i ukonjenje od strane imunog sistema (Bell i sar., 2006). Ovako oslobođen HMGB1 protein nalazi se vezan za DNK partikule i dovodi do pojave imunske tolerancije. Autofagija takođe reguliše oslobađanje HMGB1 proteina. Kod stresiranih ćelija kod kojih je došlo do aktivacije autofagije, selektivno se oslobađa HMGB1 bez liziranja ćelijske mebrane ili klasične nekroze (Thorburn i sar., 2009).

1.3.2. HMGB1 i unutarćelijski putevi signalne transdukcije

HMGB1 je evolutivno očuvan protein koji ima tri funkcionalna domena: dva bazna DNK vezujuća domena (označeni kao A i B) i kiseli karboksiterminalni domen (označen sa C), preko koga HMGB1 interaguje sa drugim proteinima. Veliki broj naelektrisanih aminokiselinskih ostataka u okviru ovih domena omogućavaju proteinu bipolarnu karakteristiku. Upravo ove bipolarnu osobine omogućavaju njegovo vezivanje za endogene i egzogene komponente (Weir i sar., 1993; Read i sar., 1993).



Slika 19. Struktura HMGB1 proteina- Preuzeto i prilagođeno iz (Chen i sar., 2013).

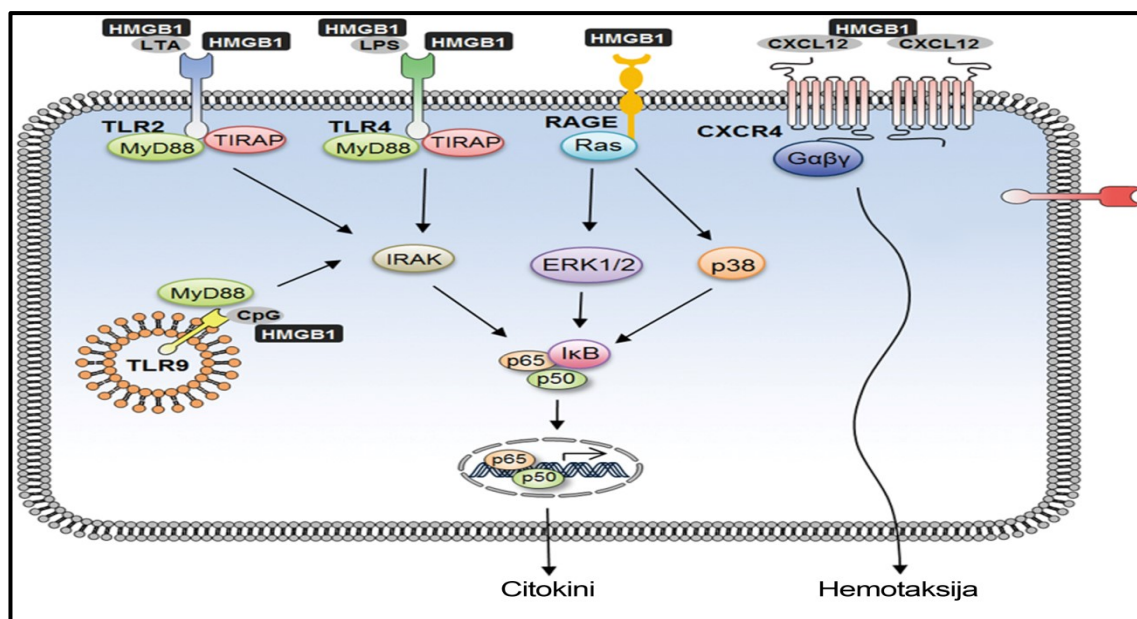
Vanćelijski HMGB1 ostvaruje svoje brojne uloge preko specifičnih receptora na površini ćelija i uticaja na određene signalne puteve u ćeliji. Do sada identifikovani receptori preko kojih deluje HMGB1 su receptori za krajnje produkte povišene glikacije (eng. receptor for advanced glycation end products, RAGE), TLR (eng. Toll like receptor) 2, 4 i 9, Mac-1, Sindekan-1 (CD138), Fosfakan protein-tirozin fosfat ϵ/β , Hemokin (C-X-C motiv) receptor 4 (CXCR4), CD24, T-ćelijski imunoglobulin mucin-3 (Erlandsson i Andersson, 2004).

Nekoliko istraživanja je pokazalo da, u vanćelijskoj sredini, B domen HMGB1 proteina biva prepoznat od strane receptora TLR4 i RAGE i da igra važnu ulogu u mnogim proinflamatornim karakteristikama ovog proteina (Huttunen i Fages, 2002; Li i sar., 2003). Nasuprot domenu B, prečišćen rekombinantni A domen nema ulogu u proinflamatornim osobinama B domena, već samo umanjuje inflamatornu kaskadu i u *in vivo* i u *in vitro* modelima (Wang i sar., 2004). Aminokiselinski niz B domena HMGB1 proteina na poziciji od 150 do 183 je odgovoran za vezivanje za RAGE receptor (Huttunen i Fages, 2002), dok je niz od 89 do 108 odgovoran za vezivanje za TLR4 (Li i sar., 2003; Yang i sar., 2004).

Prvi otkriveni receptor za HMGB1 je RAGE (Hori i sar., 1995). RAGE su članovi imunoglobinske superfamilije koji su eksprimirani u mnogim tipovima ćelija. Vezivanje HMGB1 za RAGE dovodi do aktivacije unutarćelijskog prenosa signala, pri čemu se aktiviraju NF- κ B kao i MAPK (eng. mitogen activated protein kinases) signalni putevi (Palumbo i sar., 2007). Aktivacija ovih faktora za posledicu ima produkciju i otpuštanje citokina, maturaciju i migraciju ćelija imunskog sistema (Dumitriu i sar., 2005). Aktivacija RAGE receptora od strane njegovih liganata vodi uvećanju preživljavanja jer signalni putevi posredovani ovim receptorom u uslovima smanjenog prisustva nutrijenata ili kiseonika dovode do uvećanja autofagije, smanjenja apoptoze i nekroze (Sparvero i sar., 2009)

Drugi vrlo bitni HMGB1 receptori pripadaju familiji TLR receptora. Članovi ove familije pokazuju veliku unutarćelijsku i vanćelijsku sličnost, ali vezuju različite ligande i aktiviraju različite signalne puteve. Iz ove familije, TLR2, TLR4 i TLR9 receptori imaju afinitet prema HMGB1 kao svom ligandu. Prilikom vezivanja HMGB1 za TLR2 i TLR4 dolazi do aktivacije NF- κ B i MAPK signalnih puteva (Park i sar., 2006). HMGB1 takođe dovodi i do hemotaksije inflamatornih ćelija do oštećenog tkiva nezavisno od

RAGE i TLR4 signalizacije preko formiranja kompleksa sa CXCL12 hemokinom i indukcije prenosa signala sa CXCR4. Sve ove informacije ukazuju na činjenicu da postoje specifične uloge HMGB1 receptora i na nivou tkiva i na nivou ćelija ali odnos među ovim receptorima i preklapanje signalnih puteva pokrenutih sa njih nakon vezivanja HMGB1 proteina ostaju i dalje u velikoj meri nerazjašnjeni.



Slika 20. Unutarćelijski signalni putevi posredovani interakcijama vanćelijskog HMGB1 sa receptorima.

Preuzeto i prilagođeno iz (Lee i sar., 2014).

RAGE i TLR su važni medijatori oksidativnog stresa i signali aktivirani posredstvom ovih receptora implicirani su u mnogim hroničnim bolestima (Giacco, 2010). Ovi receptori su eksprimirani i na parenhimalnim i na neparenhimalnim tipovima ćelija jetre i po literaturnim podacima od velike su važnosti za biološku aktivnost jetre i indukciju imunog odgovora posredstvom HMGB1 proteina. Ove interakcije su okarakterisane u patogenezi određenih patoloških stanja jetre kao npr. u uslovima ishemije (Andrassy i sar., 2008), hepatitisa izazvanog virusnom infekcijom, masnoj jetri i kancerogenezi (Chen i sar., 2013).

TLR2 i 4 nisu samo sposobni da indukuju i amplifikuju inflamatorni odgovor već imaju i bitnu ulogu u proliferaciji ćelija, diferencijaciji i apoptozi (Lim i sar., 2013) Tako npr. aktivacija TLR2 LPS-om promoviše apoptozu. Poznato je da TLR4, funkcioniše kao protein uključen u dijabetičnu angiopatiju preko aktiviranja signalnih

puteva koji aktiviraju transkripciju i sintezu inflamatornih faktora zbog čega je TLR4 interesantan za izučavanje dijabetesa i nastanka njegovih komplikacija. TLR4 signalni putevi ispoljavaju efekte na ekspresiju pro- i anti-apoptotskih proteina Bax i Bcl-2 čime iniciraju apoptozu preko aktivacije TLR4/NFkB signalnih puteva (Wang i sar., 2016)

1.3.3. Vanćelijski HMGB1 i patološka stanja

U vanćelijskoj sredini prisutan HMGB1 ispoljava koncentraciono-zavisnu aktivnost. U niskoj koncentraciji HMGB1 ima pozitivno dejstvo jer stimuluše imunski odgovor kojim se ograničava infekcija ili tkivno oštećenje i promovise tkivna regeneracija. Međutim, prekomerno uvećanje nivoa HMGB1 dovodi do nekontrolisanog inflamatornog odgovora, koji dovodi do tkivnih i organskih oštećenja (Wang i sar., 2004).

Pokazano je da uvećan nivo HMGB1 proteina u serumu u korelaciji sa inflamatornom patogenezi kod pacijenata sa miokardijalnom i cerebralnom ishemijom, hepatitisom B, akutnim respiratornim sindromom, reumatoidnim artritism, bakterijskim meningitism, hemoragičnim šokom i kancerom pluća i prostate (Bianchi i Beltrame, 2000). Sepsa je takođe stanje koje karakteriše prisustvo visoke serumske koncentracije HMGB1 (Goodwin i sar., 1973). Animalni modeli teške sepse i drugih inflamatornih poremećaja ukazuju da se, za razliku od „ranih“ proinflamatornih citokina (TNF, IL1 β) koji se proizvode u prvim minutima nakon stimulacije endotoksinima i koji ponovo dostižu svoj bazalni nivo tokom prvih sati progresije bolesti, HMGB1 pojavljuje tek nakon 16-72 h i oslobađa danih nakon izlaganja endotoksinu., zbog čega je i označen kao „kasni“ inflamatorni medijator (Goodwin i sar., 1973). HMGB1 je pronađen u serumu pacijenata i sa akutnom (sepsa) i sa hroničnom (reumatoidni artritis) inflamacijom, što sugerise da je on uključen u autoimune ili slabo adaptivne odgovore. Korelacije su pronađene i u slučajevima kancera prostate, grudi i pluća. Vanćelijski HMGB1 je doveden u vezu sa rastom tumora i metastazom iako još uvek nije poznat mehanizam kojim on to ostvaruje. Takođe je pokazano da tokom razvojne faze DT1, interleukin-1 stimuliše oslobađanje HMGB1 iz nekrotskih β ćelija što dovodi do aktivacije makrofaga u Langerhansovim ostrvcima što može biti jedan od bitnih okidača za razvoj ove autoimune bolesti (Zhang i sar., 2009). Isto tako pokazano je da je

HMGB1 uključen u proces odbacivanja transplantiranih Langerhansovih ostrvaca na jetru što danas predstavlja obećavajuću terapiju dijabetičnih pacijenata (Steer i sar., 2006). Stoga se danas razvijaju strategije za utišavanje inflamatornog odgovora pokrenutog prisustvom vanćelijskog HMGB1 proteina. Istraživanja su fokusirana na dizajniranje farmakoloških agenasa, poput etil piruvata i gliciricina, koji će inhibirati sekreciju HMGB1. Tretman nikotinom, takođe smanjuje serumski nivo HMGB1 (Musumeci i sar., 2013).

Zbog svog vanćelijskog prisustva i uloge signalnog molekula, HMGB1 je u fokusu mnogih istraživanja zbog njegovih mogućih korisnih i/ili štetnih efekata u terapiji pacijenata sa različitim oboljenjima. Korisni efekti se ispituju u svetlu istraživanja promena serumskog nivoa HMGB1 proteina kao potencijalnog dijagnostičkog i prognostičkog markera. Kao imunostimulatorni protein, i protein koji može da indukuje autoimunski odgovor, ukoliko se sekretuje hronično, HMGB1 se smatra terapeutskom metom u eksperimentalnim modelima infektivnih bolesti i bolesti poput reumatoidnoig artritisa, akutnog respiratornog sindroma, sepse i kancera (Chen i sar., 2013). U dijabetesu, istraživanja značaja uloge HMGB1 i molekularnih mehanizama pokrenutih ovim proteinom su na samom početku. Pretpostavlja se da bi HMGB1 oslobođen iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija jetre tokom dijabetesa mogao da dovede do imunskog odgovora i nekontrolisane inflamacije, što bi možda doprinelo napredovanju dijabetičnih komplikacija jetre i raznih bolesti. Isto tako pretpostavlja se da bi on mogao da ima važnu ulogu u odvijanju procesa apoptoze i autofagije i da bi mogao da utiče na sudbinu ćelija shodno svom nivou u vanćelijskoj sredini i sposobnosti da povezuje puteve ova dva, za ćeliju bitna, procesa.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Poremećena proliferacija ćelija i prisustvo različitih tipova ćelijske smrti (nekroze, apoptoze, autofagije) nalaze se u osnovi patoloških promena morfologije i funkcije jetre tokom dijabetesa. Jedan od proteina koji može imati važnu ulogu u određivanju funkcionalnog stanja jetre i sudbine njenih ćelija tokom dijabetesa, je HMGB1 protein. HMGB1 je prvobitno okarakterisan kao nehistski, DNK-vezujući protein sa ulogom u organizaciji hromatinske strukture i transkripciji. U određenim patološkim situacijama HMGB1 se može naći u vanćelijskoj sredini u kojoj se ponaša kao proinflamatorni citokin, aktivator imunskog sistema ali i signalnih puteva koji vode ćelijskoj smrti i/ili preživljavanju. U vanćelijsku sredinu HMGB1 dospeva pasivno, iz nekrotičnih ili oštećenih ćelija, i aktivno, regulisanom sekrecijom iz ćelija izloženih stresu i aktiviranih imunskih ćelija.

Poznato je da u uslovima oksidativnog stresa ćelije jetre *in vitro* izlučuju HMGB1 protein. HMGB1, vezivanjem u oksidovanom stanju za TLR 2/4 receptore, može učestvovati u aktivaciji puteva apoptoze, a vezivanjem, u redukovanom stanju za RAGE receptore, u aktivaciji procesa autofagije. Autofagija, osim što može dovesti do smrti ćelija sa oštećenim ili preterano aktivnim autofagnim mehanizmom, može delovati i citoprotektivno uklanjanjem oštećenih proteina i očuvanjem energije u stresnim uslovima. Smatra se da uklanjanjem oksidovanih proteina, autofagija predstavlja drugi nivo antioksidativne zaštite u ćeliji čime omogućava i njeno preživljavanje. Uslovi i molekularni mehanizmi odgovorni za kontradiktornu ulogu autofagije u regulaciji preživljavanja i smrti ćelija nisu u potpunosti poznati, iako je njihovo definisanje neophodan preduslov za razvoj terapijskih strategija zasnovanih na modulaciji autofagije. Nekroza, apoptoza i autofagija su često regulisane sličnim signalnim putevima, angažuju zajedničke organele, pa čak i dele inicijatorske i efektorske molekule kojima može da pripada i HMGB1 protein. Novija istraživanja su pokazala biološku ulogu citoplazmatskog HMGB1 proteina u endogenoj aktivaciji autofagije. HMGB1 se u uslovima ćelijskog stresa translocira iz jedra u citoplazmu i aktivno učestvuje u formiranju autofagozoma i održavanju autofagije. Kako je translokacija

HMGB1 proteina u citoplazmu i njegovo oslobađanje iz ćelije zavisno od stepena oksidativnog stresa, moguće je da HMGB1 igra bitnu ulogu u modulaciji ravnoteže između puteva koji vode ćelijskoj smrti i onih koji obezbeđuju prevazilaženje nastalih oštećenja i oporavku jetre tokom dijabetesa.

Ako pretpostavimo da se u dijabetesu aktivira trajan proces otpuštanja HMGB1 proteina kao odgovor na aktivaciju ćelijskih stresogenih signala oksidativnim stresom, i njihova ponovna aktivacija parakrinim dejstvom HMGB1, to znači da HMGB1 može biti važan parakrini medijator disfunkcije jetre. Kako je za predikciju i prevenciju pojave dijabetičnih komplikacija u jetri važno identifikovati endogene molekule koji svojim delovanjem mogu da doprinesu njenom oštećenju, opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije jeste (i) ispitivanje uloge HMGB1 proteina u regulaciji različitih tipova ćelijske smrti u jetri pacova sa dijabetesom i (ii) na koji način procesi ćelijske smrti doprinose patološkim promenama u jetri. Očekuje se da bi dobijeni rezultati mogli da ukažu na nove potencijalne puteve terapijskih strategija koje bi uključivale modulaciju aktivnosti HMGB1 proteina.

Da bi se ostvario opšti cilj, za neposredne ciljeve istraživanja određeno je da se na model sistemu dijabetesa indukovano jednkrotnim injeciranjem streptozotocina, kod mužjaka pacova soja Wistar u ćelijama jetre ispituju:

1. Korelacije između stepena oštećenja jetre u dijabetesu sa oksidativnim stresom, tipovima aktiviranih procesa ćelijske smrti i vanćelijskim i citoplazmatskim nivoima HMGB1 proteina;
2. Interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 i RAGE receptorima ćelija jetre u dijabetesu, i promene koje nastaju u prisustvu melatonina kao antioksidansa ili etil piruvata kao inhibitora aktivne sekrecije HMGB1 proteina;
3. Uticaji interakcija HMGB1 sa TLR4 receptorima na aktivaciju pro- i anti-apoptotskih puteva u dijabetesu, u odsustvu ili prisustvu melatonina ili etil piruvata;
4. Dijabetesom indukovane promene u nivou i aktivnosti proteina odgovornih za formiranje autofagozoma (LC3-II, p62, Beklin1) i interakcije citoplazmatskog HMGB1 proteina sa Beklin1, u odsustvu ili prisustvu melatonina ili etil piruvata.

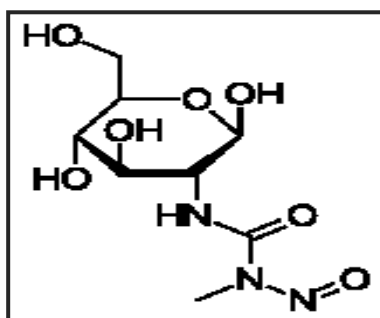
5. Odnos između negativnih (pro-apototskih i pro-nekrotskih) i pozitivnih (u protektivnoj autofagiji) efekata HMGB1 proteina u dijabetesu, u odsustvu ili prisustvu melatonina ili etil piruvata.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Primenjene hemijske supstance

3.1.1. Streptozotocin

Za izazivanje dijabetesa korišćen je streptozotocin (STZ, MP Biomedicals, LLC). Rastvaranje STZ izvršeno je u svežem natrijum (Na)-citratom puferu (0,1 mol/l, pH 4,5) koji je odmah nakon pripreme injeciran pacovima jednokratno, intraperitonealnim putem, u dozi od 65 mg/kg telesne mase pacova. Pacovi sa nivoom glukoze u krvi višim od 20 mmol/l, 48 h nakon injeciranja STZ-a su smatrani dijabetičnim.

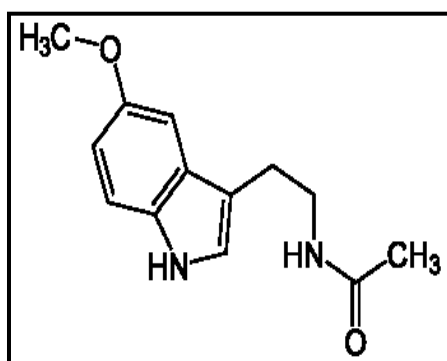


Slika 21. Hemijska struktura streptozotocina.

STZ je derivat nitrozouree. On je citotoksični analog glukoze čije se dijabetogeno dejstvo zasniva na toksičnom dejstvu na β ćelije pankreasa. U ove ćelije STZ ulazi preko glukoznog transportera tipa 2 i podleže spontanom razlaganju pri čemu nastaje reaktivni metilkarbonijum jon koji dovodi do alkilacije DNK i narušavanje njene strukture. Oštećenje DNK indukuje preteranu aktivaciju PARP-1 proteina što dovodi do smrti ćelije usled energetske gubitka. Osim toga povećana defosforilacija ATP-a posle tretmana sa STZ povećava nivo supstrata za ksantin oksidazu što rezultuje formiranjem ROS, a posledično stvaraju se H_2O_2 i drugi radikali. Krajni rezultat je destrukcija β -ćelije pankreasa putem nekroze, i hipoinsulinemija i hiperglikemija (Lenzen, 2008).

3.1.2. Melatonin

U cilju smanjenja stepena oksidativnog stresa kod pacova sa dijabetesom i oksidativnog oštećenja ćelija jetre, korišćen je melatonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Melatonin (eng. N-acetyl-5-methoxytryptamine) je endogeni hormon koji uglavnom luči epifiza i primarna uloga mu je u regulaciji cirkadijalnog ritma. Melatonin ima snažan antioksidativni potencijal jer je sposoban da direktno detoksifikuje slobodne radikale, štiti jedarnu i mitohondrijalnu DNK i modifikuje aktivnost prooksidativnih i antioksidativnih enzima (Anwar i Meki, 2003).

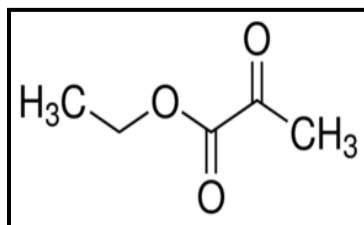


Slika 22. Hemijska struktura melatonina

Rastvor melatonina je pripreman u 1% etanolu, na nedeljnom nivou. Na osnovu podataka iz literature (Montilla i sar., 1998), dnevna primena melatonina u dozi od 0,2 mg/kg telesne mase efikasna je u zaštiti dijabetičnih pacova od oksidativnog stresa. U skladu sa tim, u tretmanu pacova melatoninom korišćena je ova doza, koja je injecirana intraperitonealno, jednom dnevno, u 9:00 časova. Tretman melatoninom je započet tri dana pre iniciranja STZ i primena je nastavljena svakodnevno, do kraja eksperimentalnog perioda.

3.1.3. Etil-piruvat

Etil piruvat (EP) je derivat pirogrogđane kiseline i poznat je po svojoj ulozi u stišavanju inflamacije, između ostalog i preko sprečavanja aktivne sekrecije HMGB1 proteina i smanjenja njegove ekspresije u vanćelijskoj sredini. Za translokaciju HMGB1 proteina iz jedra u citoplazmu neophodna je njegova fosforilacija na serinskim ostacima koja je posredovana aktivnostima dve kalcijum-zavisne kinaze, klasične protein kinaze C i kalcijum/kalmodulin – zavisne kinaze tipa IV. Kako je EP helator Ca^{2+} , uklanjanjem viška kalcijuma onemogućava se aktivnost kalcijum-zavisnih enzima i njima posredovane aktivnosti u sekreciji HMGB1 proteina (Kim i sar., 2016).



Slika 23. Hemijska struktura etil piruvata

U cilju smanjenja prisutnosti vanćelijskog HMGB1 proteina korišćen je EP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), koji je rastvaran u Ringerovom rastvoru. EP je injeciran jednom dnevno, intraperitonealno u dozi od 80 mg/kg telesne mase, u finalnoj zapremini od 400 μl (Liang i sar., 2009). Tretman je započet desetog dana od indukcije dijabetesa STZ-om i trajao je do kraja eksperimentalnog perioda.

3.2. Eksperimentalne životinje, eksperimentalne grupe i protokol

3.2.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentalnom radu korišćeni su albino mužjaci pacova soja Wistar stari oko 2 meseca, težine 180 – 220 g, uzgajani u uzgajilištu Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu. Eksperimentalne životinje su gajene pod kontrolisanim uslovima, na temperaturi oko 20-22 °C, vlažnosti vazduha 50-60% i održavanju cirkadijalnog ritma (smene dana i noći u trajanju od po 12 časova) . Sve eksperimentalne procedure koje su sprovedene na životinjama u ovoj tezi su odobrene od strane Etičkog komiteta Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković” (broj odobrenja: 02-15/10) i u skladu su sa propisanim etickim normama (Guide for the care and use of laboratory animals, objavljenog od strane US National Institute of Health).

3.2.2. Eksperimentalne grupe

Nakon što je utvrđeno da kontrolni pacovi injecirani fiziološkim rastvorom, Na-citratnim puferom, 1% etanolom ili Ringerovim rastvorom nisu pokazivali značajne razlike u pogledu svih ispitivanih parametara prikazanih u tezi, oformljeno je šest eksperimentalnih grupa: (K), kontrolna grupa koja je tretirana samo fiziološkim rastvorom, n=15; (D), dijabetična grupa, n=15; (K+M), grupa kontrolnih pacova tretirana melatoninom, n=15; (D+M), grupa dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom, n=15; (K+EP) grupa kontrolnih pacova tretirana etil-piruvatom, n=10; (D+EP), grupa dijabetičnih pacova tretirana etil-piruvatom, n=10.

3.2.3. Protokol

Nakon 4 nedelje od indukcije dijabetesa, kontrolni i tretirani pacovi su mereni i određivan je nivo glukoze iz uzorka krvi dobijenog iz repne vene, korišćenjem ručnog glukometra (GlucoSure Plus, Apex Biotechnology Corp, Taiwan). Nakon toga pristupilo se žrtvovanju dekapitacijom. Jedan deo krvi sakupljen je u epruvete radi dobijanja seruma, a drugi deo u epruvete sa heparinom radi dobijanja plazme.

Sakupljena krv ostavljena je 20 min na sobnoj temperaturu da koaguliše a zatim centrifugirana na 5,000 rpm (Eppendorf 5415 R centrifuga) 15 min. Serum, odnosno plazma, dobijeni u vidu supernatanta iznad taloga krvnih ćelija, su alikvotirani i čuvani na -80°C do korišćenja. Uzorci seruma su korišćeni za određivanje koncentracije insulina, alanin (ALT), i aspartat (AST) aminotransferaza kao i za analizu nivoa HMGB1 proteina. Plazma je korišćena za određivanje koncentracije H₂O₂, O²-i tiobarbituratna kiselina – reagujuće supstance.

Odmah po dekapitaciji pristupljeno je brzom izolaciji jetre pojedinačnih životinja, merenju izolovanog tkiva i odvajanju dela tkiva za pripremu histoloških preparata, komet eseja i pripremu homogenata za ispitivanje aktivnosti antioksidativnog sistema. Ostatak tkiva je zamrznut u tečnom azotu i ostavljen na čuvanje na -80°C .

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje koncentracije insulina u serumu

Serumske koncentracije insulina određivane su enzimskim imunoesejem (eng. enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) prema priloženom uputstvu proizvođača (Mercoxia Rat Insulin ELISA, Upssala, Sweden). Princip procedure zasniva se na direktnoj sendvič tehnici u kojoj se koriste dva monoklonska antitela koja su specifična za različite antigene determinante pacovskog insulinskog molekula. Za vreme inkubacije insulin iz testiranog uzorka reaguje sa jedne strane sa anti-insulinskim antitelom koje je vezano za dno bunarića u mikrotitar ploči, a sa druge strane sa anti-insulinskim antitelom konjugovanim sa peroksidazom iz rena koje se detektuje reakcijom sa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinom (TMB).

Svi rastvori su pripremani prema uputstvu proizvođača (peroksidazom konjugovano monoklonsko anti-insulin antitelo i pufer za ispiranje) i temperirani na sobnu temperaturu pre upotrebe. U odgovarajuće bunariće mikrotitar ploče koji su obloženi antitelom na insulin dodavani su, po unapred utvrđenom redosledu, standardi (0,15, 0,4, 1,0, 3,0, 5,5 µg/l) i ispitivani uzorci seruma u zapremini od 25 µl. Svi standardni i uzorci nanošeni su u triplikatu. U bunariće je zatim dodavano po 50 µl rastvora enzimskog konjugata (peroksidazom konjugovano monoklonsko anti-insulin antitelo) i vršena je inkubacija u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi. Potom su svi

bunarići ispirani 5 puta sa po 350 µl pufera za ispiranje. Nakon poslednjeg ispiranja dodavano je po 200 µl substrata (TMB) u svaki bunarić i vršena je inkubacija u trajanju od 15 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µl stop rastvora, nakon čega je u ELISA čitaču merena apsorbancija na 450nm. Na osnovu apsorbancije standarda formirana je standardna kriva sa koje su očitane vrednosti odgovarajućih koncentracija insulina u ispitivanim serumima izražene u pmol/l.

3.3.2. Određivanje serumske koncentracije ALT i AST

Katalitička koncentracija AST u serumu pacova je merena IFCC (eng. international federation of clinical chemistry and laboratory medicine) metodom. U reakciji transaminacije, između L-Aspartata i 2-ketoglutarata nastaje oksalacetat. Oksalacetat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane malat dehidrogenaze, oksiduje nikotinamid adenin dinukleotid (eng. nicotinamide adenine dinucleotide, NADH). U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji AST.

Katalitička aktivnost ALT u serumu pacova je merena metodom IFCC. U reakciji transaminacije, između L-Alanina i 2-oksoglutarata nastaje piruvat. Piruvat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane laktat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji ALT.

Dobijene vrednosti za AST i ALT su izražavane su u jedinicama/litru (U/l).

3.3.3. Određivanje koncentracije O_2^- , H_2O_2 i TBARS u homogenatima jetre

3.3.3.1. Određivanje koncentracije O_2^-

Određivanje stvaranja O_2^- u homogenatima tkiva zasniva se na redukciji nitro plavo tetrazolijuma (NBT) do monoformazana dejstvom O_2^- , što se koristi kao mera stvaranja O_2^- u hemijskim i biološkim sistemima (Auclair i Voisin, 1985). Redukcija NBT-a odvija se u dva koraka; kao nepotpuna redukcija do monoformazana: $NBT + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2^- + \text{monoformazan}$; kao kompletna redukcija NBT-hlorida do diformazana:

$\text{NBT}^{++} + 2\text{Cl}^- + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow \text{diformazan} + 2\text{HCl}$ u oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je njegova redukcija u diformazan praćena promenom u intenzivnu plavu boju i smanjenjem rastvorljivosti. Reakcionu smešu čine 1 mmol NBT (rastvorenog u 0,05 mol fosfatnom puferu, pH 8,6 sa 0,1 mmol EDTA) i 0,1 mg/mL želatina, koji NBT-formazan održava u rastvoru. Rastvor NBT je jedan h bio izložen dejstvu azota pod pritiskom, što je imalo za cilj da smanji napon kiseonika u medijumu. Reakcija je otpočinjala dodavanjem 0,05 mL uzorka u 1 mL reakcione smeše, a promena ekstinkcije praćena je u toku 5 min na talasnoj dužini 550 nm. Stvaranje O^{2-} izražavano je kao nmol redukovanog NBT/min/mg proteina

3.3.3.2. Određivanje koncentracije H_2O_2

Određivanje koncentracije H_2O_2 u homogenatima jetre je izvedena po metodi Pick i Keisari (1980). Sveže tkivo jetre je homogenizovano u 250 mM sukrozi, 1 mM EDTA i 50 mM Tris-HCl, pH 7,4. Homogenati su zatim centrifugirani 90 min na 100 000xg nakon čega je supernatant pažljivo odliven i korišćen za analizu koncentracije H_2O_2 . Esej je baziran na oksidaciji fenol crvene sa H_2O_2 katalizovano peroksidazom rena što ima za rezultat formiranje jedinjenja sa povišenom apsorbancom na 610 nm. Smeša u kojoj se nalazi 0,1 ml svežeg homogenata jetre i 1 ml rastvora fenol crvenog je inkubiran na sobnoj temperaturi 10 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1N NaOH dok pH smeše nije postigla 12,5. Apsorbanca uzorka je merena na 610 nm. H_2O je služila kao slepa proba. Koncentracija H_2O_2 je izračunata iz standardne krive za H_2O_2 i izražavana u nmol/ml homogenata.

3.3.3.3. Određivanje koncentracije TBARS

Intenzitet lipidne peroksidacije određivan je u uzorcima homogenata jetre (Ohkawa i sar., 1979). Princip metode je baziran na spektrofotometrijskom određivanju proizvoda lipidne peroksidacije (MDA) i tiobarbiturne kiseline (eng. thiobarbituric acid, TBA) u kiseljoj sredini na 532 nm. 10% homogenatu tkiva jetre pripremljenom u 1,15% rastvoru KCl (0,1 ml) dodaje se 8,1% SDS (0,2 ml), 20% CH_3COOH , pH 3,5 (1,5 ml), 0,8% vodeni rastvor TBA (1,5 ml) i 0,7 ml dH_2O . Smeša je inkubirana na 95°C jedan h, a zatim ohlađena na sobnu temperaturu. Ohlađenoj smeši dodaje se 5 ml n-butanola i

piridina (15:1, v/v) i 1 ml dH₂O, uz jako mešanje. Uzorci se centrifugiraju 15 min na 3000 g pri čemu se odvajaju dva sloja. Koncentracija tiobarbituratna kiselina – reagujuće supstance (eng. thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) meri se u obojenom sloju na talasnoj dužini 532 nm. Kao standard upotrebljava se tetrametoksipropan (malonaldehid tetrametil acetal). Koncentracija TBARS izražena je u nmol/mg proteina.

3.3.4. Određivanje DNK oštećenja u jetri pomoću komet eseja (eng. SCGE – single cell gel electrophoresis)

Za procenu oštećenja DNK u ćelijama jetre korišćen je alkalni komet esej po metodi Singh-a (1988). Za komet esej korišćene su ćelije jetre dobijene sukcesivnim sitnjenjem tkiva u hladnom HBSS puferu (0,14 g/l CaCl₂, 0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l MgCl₂x6H₂O, 0,1 g/l MgSO₄x7H₂O, 8,0 g/l NaCl, 0,35 g/l NaHCO₃, 0,09 g/l Na₂HPO₄x7H₂O, 1,0 g/l D-glukoze) koji je sadržavao 20mM EDTA i 10% DMSO (dimetilsulfoksid). Jetra je isečena na krupne komade, ostavljena da se slegne, a pufer u kome je sečena je aspiriran. Na jetru je dodat svež pufer i ceo postupak je ponovljen. Treći put je jetra isitnjena na fine komadiće i iz suspenzije je uzeto 10 µl po uzorku. Uzorak ćelijske suspenzije je pomešan sa 75 µl 1% LMPA (eng. low melting point agarose) koja je pretemperirana na 42 °C i uzorak je razliven ravnomernim nakapavanjem na prethodno pripremljenu mikroskopsku pločicu. Priprema pločice se sastoji u prekrivanju pločice 1,5% agarozom koja nakon sušenja predstavlja tanak sloj na koji se dalje nanosi uzorak. Obe vrste agarose su napravljene u PBS puferu (20mM Na₂HPO₄, 10mM KCl, 70mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7,4). Nakon nanošenja uzorka u LMPA, mikroskopska pločica je prekrivena pokrovnim staklom i ostavljena 10 min da se agarozna stegne. Pokrovno staklo je uklonjeno i nanesen je još jedan sloj 1% LMPA, pokriven pokrovnim staklom koje je nakon stezanja agarose uklonjeno. Mikroskopske pločice su zatim stavljene u hladan pufer za lizu. (2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0) koja se odvijala dva h na 4°C. Nakon lize, mikroskopske pločice su inkubirane u puferu za elektroforezu (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH 13,0) 30 min na 4°C sa ciljem denaturacije DNK na baznom pH. Mikroskopske pločice su zatim postavljene u sistem za elektroforezu, koja je išla 30 min na 0,01 kV i 139 mA. Nakon toga, pločice su isprane 3x5 min u puferu za

neutralizaciju (0,4 Tris-HCl, pH 7,4) i bojene sa bojom za nukleinske kiseline SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich, S 9430). Komete su vizualizovane i fotografisane pomoću fluorescentnog mikroskopa Leica DMLB (uvećanje 40x) koji je povezan sa CCD kamerom.

Komete su klasifikovane vizuelnom metodom u 5 kategorija: 0, 1, 2, 3 i 4. Kategoriji 0 pripadaju ćelije bez oštećenja kategorijama 1, 2 i 3 ćelije sa kratkom srednjom i dugačkom migracijom DNK, dok kategoriji 4 pripadaju ćelije sa veoma velikim oštećenjima (mala glava i dugačak rep komete). Kvantifikacija parametara kometa je urađena upotrebom kompjuterskog programa TriTekCometScore™ Freeware v1.5. Prikazan je parametar momenat repa – „tail moment” (proizvod dužine repa i procenta DNK u repu komete). Sve vrednosti su date u arbitrarnim jedinicama.

3.3.5. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri

Za merenje aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri korišćen je 10% homogenat sveže jetre pripremljen u sukroznom puferu (250 mM sukroza, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) koji je centrifugiran na 100,000xg (90 min, +4 °C) i supernatanti su čuvani na -80°C do korišćenja.

3.3.5.1. Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT je određena po metodi Beutler-a (1982). Reakcija se zasniva na stepenu degradacije H₂O₂ aktivnošću katalaze prisutne u uzorku. Reakcija se odigravala u inkubacionoj smeši koja je sadržala TE pufer pH 8.0 (1M TRIS -HCl pH 8,0, 5mM EDTA), homogenat jetre i 10 mM H₂O₂.

U staklenu kivetu dodavano je 1,5 ml podešenog rastvora H₂O₂ u TE puferu i uzorak (5-10µl). Reakcija je započinjala dodavanjem uzorka, a pad apsorbance je praćen spektrofotometrijski na 230 nm u toku tri min na temperaturi od 25°C. Da bi se izbeglo formiranje mehurića tokom oslobađanja kiseonika u toku reakcije, važno je da koncentracija H₂O₂ bude tačno 10 mM. Koncentracija H₂O₂ je određivana tako što je merena apsorbance 0,9 ml 1 M TE pufera, pH 7,0 (razblažen sa destilovanom vodom u odnosu 1:10) i dobijena je apsorbance A1. Zatim je dodavano 0,1 ml 30% H₂O₂ (razblažen sa destilovanom vodom u odnosu 1:100) i izmerena je apsorbance A2.

Milimolarni ekstinkcioni koeficijent za vodonik peroksid na 230 nm iznosi 0,071, dok je koncentracija razblaženog vodonik peroksida $C=141$ mmol (A2-A1). Rastvor H_2O_2 koncentracije od 10 mmol dobijan je kada je H_2O_2 razblaživan destilovanom vodom u odnosu $C/10$.

Aktivnost CAT je izražavana u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina). Jedinica aktivnosti katalaze je definisana kao broj milimolova H_2O_2 redukovanih u min ($\mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}$).

3.3.5.2. Određivanje aktivnosti SOD

Aktivnost ukupnog SOD je merena epinefrinskom metodom (Misra i sar., 1972). Metoda se bazira na merenju nivoa inhibicije autooksidacije epinefrina aktivnošću SOD prisutne u uzorku koji je rastvoren u 50mM Na karbonatnom puferu pH 10,2. Spektrofotometrijski se pratilo smanjenje brzine autooksidacije adrenalina koja je zavisna od super oksid anjon radikala koga uklanja SOD.

U staklenu kivetu dodavano je 3 ml Na karbonatnog pufera, uzorak i količina podešenog rastvora adrenalina. Apsorbanca je dobijena očitavanjem na 480 nm, na temperaturi od 25 °C tokom 10 min a očitavanje se vršilo na svaki min. Za izračunavanje vrednosti SOD koristila se vrednost promene apsorbance uzorka prema slepoj probi (3 ml Na karbonatnog pufera + količina adrenalina čija je promena apsorbance u opsegu od 0,020 do 0,022) Jedinica aktivnosti SOD definiše se kao količina enzima koja izaziva 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance.

Aktivnost SOD za tkivo jetre predstavlja ukupnu aktivnost ovog enzima koga čine CuZnSOD i MnSOD. Aktivnost SOD izražavana je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina).

3.3.5.3. Određivanje aktivnosti GST

Aktivnost GST je određena spektrofotometrijski po metodi Habig-a (1974) koja se bazira na reakciji 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa -SH grupom GSH koja je katalizovana GST-om koji je prisutan u uzorku. Reakciona smeša, koja je sadržala 0,5 M fosfatni pufer pH 6,5 (KH_2PO_4 i K_2HPO_4), 30 mM CDNB u destilovanoj vodi je prvo

inkubirana na 37°C 5 min, a reakcija je započeta dodavanjem homogenata jetre i 20mM GSH.

U kvarcnu kivetu dodavano je 1,5 ml destilovane vode, 0,1 ml CDNB-a, 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,3 ml GSH, a reakcija je započinjala dodavanjem uzorka jetre i GSH. Povećanje promene apsorbance praćeno je spektrofotometrijski prema slepoj probi (dodavani su svi rastvori kao za analizu sem uzorka) na talasnoj dužini od 340 nm na temperaturi od 25 °C svakih 30 s tokom tri min.

Aktivnost GST u jetri je izražena u nanomolima GSH utrošenih u min na mg proteina (nmol GSH/min/mg proteina⁰U/mg proteina).

3.3.6. Priprema ukupnog homogenata jetre

Ukupni homogenat jetre pripreman je prema proceduri Choi i Waxman (1999). Tkivo jetre (200mg) je mehanički usitnjeno a zatim homogenizovano u ručnom staklenom homogenizeru na +4°C, u puferu za homogenizaciju (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 250 mM sukroza) koji je sadržao mešavinu proteaznih i fosfataznih inhibitora (5 mg/ml aprotinin, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO₃, 5 mg/ml leupeptin). Dobijeni homogenati jetre su centrifugirani na 3,000xg, 20 min na +4°C u Eppendorf 5415 R centrifugi. Odvojeni supernatant alikvotiran je i čuvan na -80°C do upotrebe.

3.3.7. Priprema citosolne i mitohondrijalne frakcije ćelija jetre

Tkivo jetre je mehanički usitnjeno a zatim homogenizovano u ručnom staklenom homogenizeru na +4°C, u puferu za homogenizaciju (20 mM Tris pH 7,0, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 20mM Na-fosfatni pufer) koji je sadržao mešavinu proteaznih i fosfataznih inhibitora (5 mg/ml aprotinin, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO₃, 5 mg/ml leupeptin). Ovako dobijeni homogenati su centrifugirani na 3,000xg 15 min na +4°C. Dobijeni supernatant se koristio za izolaciju citosolne i mitohondrijalne frakcije. Prvo je supernatant centrifugiran na 11,000xg na +4°C. Novodobijeni supernatant (SN2) se koristio za dobijanje citosolne a talog za dobijanje mitohondrijalne frakcije. SN2 je centrifugiran na 100,000xg, na +4°C, u trajanju od 60 min čime je dobijena čista frakcija citosola koja je alikvotirana i čuvana na -80°C do upotrebe.

Talog je ispran u 500 μ l pufera za homogenizaciju, a zatim centrifugiran 20min na 12 000xg na +4°C. Nakon toga talog je resuspendovan u 500 μ l pufera za liziranje mitohondrija (50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 5% glicerol, 1mM EDTA, 5 mM DTT, 0,05% Triton X-100) koji je sadržao mešavinu proteaznih i fosfataznih inhibitora (5 mg/ml aprotinin, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO₃, 5 mg/ml leupeptin). Nakon inkubacije od 30 min na +4°C talog je dodatno centrifugiran na 15,000xg čime je dobijena čista frakcija mitohondrija u supernatantu koji je alikvotiran. Dalje analize mitohondrijalne frakcije su urađene odmah nakon izolacije zbog brzog propadanja uzorka.

3.3.8. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina u ukupnim homogenatima jetre, citosolnom i mitohondrijalnim frakcijama određivane su po metodi Lowry-a i sar. (1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza proteina i kupri jona u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom i triptofanom sadržanim u proteinima. Uzorak proteina zapremine 5-10 μ l razblažen je vodom do finalne zapremine od 200 μ l i pomešan sa 3 ml sveže pripremljenog rastvora koji se dobija mešanjem 1 ml 1% CuSO₄x5H₂O, 1 ml 2% K-Na-tartarata i 98 ml 2% Na₂CO₃ u 0,1 N NaOH. Nakon inkubiranja smeše 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodat Folinov reagens razblažen u odnosu 1:2 (v/v). Posle 30 min, koliko je potrebno da se razvije boja, merene su apsorbance uzoraka na 720 nm napram "slepe" probe, na spektrofotometru (Shimatzu UV-160). Koncentracije proteina očitavane su sa standardne prave (A720) u funkciji koncentracije proteina, konstruisane polazeći od standardnih koncentracija serumskog albumina govečeta.

3.3.9. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Za razdvajanje i karakterizaciju proteina prema molekulskim masama korišćena je tehnika jednodimenzionalne elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, u prisustvu N-dodecilsulfata (SDS-PAGE), koju je opisao Laemmli (1970). Gel za razdvajanje je bio 12% poliakrilamidni gel u 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED. Pufer za elektroforezu je bio 192mM glicin, 25 mM Tris-HCl (pH 8,3) i 0,1% SDS. Serumi koji su analizirani ovom metodom su razblaživani u odnosu 1:100 u

5Xpuferu za uzorke (500mM Tris-HCl, pH 6,8, 10%SDS, 5% β -merkaptoetanol, 50% glicerol) i kuvani 3 min na 95°C, a zatim je iz razblaženja uzimano 20 μ l po uzorku za elektroforetsko razdvajanje. Proteini iz ukupnog homogenata, citosolne i mitohondrijalne frakcije su rastvarani odnosu 1:1 u 2X Laemli puferu za denaturaciju proteina (2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% β -merkaptoetanol i 8.8% glicerol) a zatim kuvani 3 min na 95°C. Pufer za elektroforezu je bio 192 mM glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3 i 0.1% SDS. Elektroforeza je trajala ukupno jedan h na voltaži od 0,12 kV kroz gel za skoncentrisavanje i na 0,15kV kroz gel za razdvajanje. Za elektroforezu je korišćen BioRad sistem (Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell.). Nakon elektroforeze, proteini sa gelova su prenošeni na membrane.

3.3.10. Prenos proteina na membrane

Proteini razdvojeni na jednodimenzionalnoj SDS-PAGE preneti su na odgovarajuće membrane pod uticajem električne struje po metodi Burnette-a (1981). Korišćene su polivinildifluorid (PVDF) membrane (polyvinylidene difluoride, Hybond-P, RPN303F, Amersham Pharmacia Biotech), koje su optimizirane za prenos proteina. Prenos je rađen u mini aparatu za transfer (Bio-Rad, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Neposredno po završetku elektroforeze, gelovi i membrane odgovarajuće veličine potopljeni su nezavisno u ohlađeni pufer za prenos u sastavu: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicin, 20% metanol. Nakon 30 min, gel i membrana položeni su u sendvič od filter papira (Whatman 3MM) i suđera i postavljeni u aparat za transfer. Pod uticajem konstantne struje prenos je išao preko noći na 0,030 kV i 0,06A. Po završenom prenosu, filteri su bojani Ponceau-om: 1% Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini, a gelovi Coomassie-plavim, kako bi se proverili ispravnost transfera i elektroforeze.

3.3.11. Imunoblot analiza proteina

Imunoblot analiza proteina rađena je po modifikovanoj metodi Towbin-a i sar. (1979). Membrane sa prenetim proteinima ispirane su 2 do 3 puta u trajanju od 10 min, u 0,2% rastvoru Tween 20 u TBS puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl), skraćeno TBS-T. Nakon ispiranja, membrane su blokirane u rastvoru za blokiranje u

sastavu: 5% nemasno mleko u prahu, izuzev ukoliko su membrane probane sa fosfoantitelima kada se koristio serum govečeta u TBS-T puferu umesto mleka u istim procentima (Blotto, sc-2325, Santa Cruz Biotechnology) rastvoreno u TBS-T puferu, 45 min, na sobnoj temperaturi, uz lagano mešanje. Membrane su zatim ispirani sa dve brze izmene pufera, pa 1x15 min, 2x5 min u TBS-T. Potom su inkubirani sa primarnim antitelom, razblaženim u odgovarajućem odnosu, u 3% mleku ili serumu govečeta u zavisnosti od antitela u TBS-T puferu, 1:30 h na sobnoj temperaturi, uz lagano mešanje. Po završenoj inkubaciji, membrane su ispirane sa dve brze izmene pufera, zatim 1x15, 2x5 min u TBS-T. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom koje je konjugovano peroksidazom iz rena u odgovarajućem razblaženju, u rastvoru 3% mleka u TBS-T, 1 h na sobnoj temperaturi, uz lagano mešanje. Nevezana antitela su uklonjena ispiranjem nekoliko puta u TBS-T (1x15, 4x5 min). Nakon toga, rađena je vizuelizacija nagrađenih antigen-antitelo kompleksa bojenjem membrana luminol reagensom (Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent, Solution A and Solution B, Santa Cruz Biotechnology, sc-2048) i stavljanjem pod filmove (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN 3103 K) prema uputstvima proizvođača. Za ponovno korišćenje iste membrane za drugo antitelo, membrana je inkubirana 35 min na 50°C u puferu za striping (100mM b-Mercaptoethanol, 2%SDS 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8), zatim isprana tri puta po 30 min u TBS-T puferu, blokirana u rastvoru 10% mleka u TBS-T 10 minuta a zatim inkubirana sa drugim antitelom po istom principu.

Kvantifikacija proteina je urađena u programu TotalLab (Phoretix) v1.1 i izražena kao relativna vrednost.

Tabela 2. Podaci o primarnim antitelima korišćenim u Western imunoblot analizi

Antigen	Molekulska masa (kDa)	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
HMGB1	29	zečije	Abcam	1:1000
PARP-1	116	zečije	Santa Cruz	1:1000
p85-PARP-1	85	zečije	Proomega	1:1000
Bax	25	zečije	Cell signaling	1:1000
Bcl-2	28	zečije	Cell signaling	1:1000
Beklin1	60	zečije	Sigma-Aldrich	1:1000
Akt 1/2/3	60	zečije	Santa Cruz	1:1000
p-Akt	60	zečije	Santa Cruz	1:750
JNK	46,54	mišije	Santa Cruz	1:1000
p-JNK	46	kozije	Santa Cruz	1:750
ERK	42,44	zečije	Santa Cruz	1:1000
p-ERK	42,44	zečije	Santa Cruz	1:750
citohrom C	12	mišije	Santa Cruz	1:1250
prokaspaza3	32	zečije	Santa Cruz	1:750
kaspaza3	19,17	zečije	Cell signaling	1:1000
LC3	19,17	zečije	Sigma-Aldrich	1:1000
p62	62	zečije	Cell Signaling	1:1000
β aktin	44	zečije	Abcam	1:2000
COX IV	17	zečije	Sigma-Aldrich	1:1000

3.3.12. Imunoprecipitacija

Ova metoda omogućava izdvajanje proteina iz proteinske frakcije ili ćelijskog lizata. Zasniva se na interakciji željenog proteina sa odgovarajućim antitelom koji grade kompleks. Odvajanje formiranog kompleksa od ostalih proteina omogućava se dodavanjem specifičnog nesolubilnog proteina, označenog kao Protein A ili Protein G, koji vezuje antitelo. Proteini A i G konjugovani su sa nesolubilnim matriksom koji može biti agarozna ili sefaroza. Centrifugiranjem se formira talog koji sadrži kompleks antigen-antitelo-Protein A/G, iz kojeg se antigen oslobađa u supernatantu nakon kuvanja u puferu sa SDS-om i centrifugiranja. Izdvojeni supernatant koji sadrži imunoprecipitovani protein kao i proteine koji su sa njim u interakciji, razdvaja se na SDS-PAGE i dalje analizira imunoblot-om. Metoda ima primenu u izučavanju: biohemijskih osobina proteina, posttranslacionih modifikacija, protein-protein interakcija.

U ovom doktoratu imunoprecipitacija je urađena pod uslovima opisanim kod Uskoković i sar. (2012). Proteini homogenata jetre i citoplazmatski proteini (200 µg)

inkubirani su sa 2 μg primarnog mišijeg anti-HMGB1 (Sigma-Aldrich) i zečijeg Beklin1 antitela (Sigma-Aldrich) u hladnom puferu za imunoprecipitaciju (10mM TRIS-HCl, pH 7,6, 4mM EDTA, i 50 mM NaCl) u koji su dodati inhibitori proteaza i fosfataza (5 mg/ml aprotinin, 0,1 mM PMSF, 1 mM NaVO_3 , 5 mg/ml leupeptin), u finalnoj zapremini od 800 μl ,preko noći, na 4°C. Sutradan su prvo pripremljene agarozne kuglice kuplovane sa A/G proteinom (Santa Cruz Biotechnology sc-2003). Kuglice su pripremljene ispiranjem tri puta u hladnom puferu za imunoprecipitaciju uz centrifugiranje (9300 g, 1 min, 4°C). Isprane kuglice (50 μl) su zatim prebačene u epruvete od 1,5 ml i na njih je nalivena kompletna smeša prethodno inkubiranih proteina sa antitelom. Inkubacija je nastavljena 1h na +4°C, na rotirajućoj platformi. Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran (9300xg, 1 min, 4°C). Supernatant je pažljivo odličen, a talog kuglica je ispran pet puta sa po 500 μl hladnog pufera za imunoprecipitaciju, centrifugiranjem (9300xg, 1 min, 4°C). Nakon poslednjeg ispiranja supernatant je pažljivo otklonjen, a na talog koji predstavlja imunoprecipitovane proteine, je dodato 50 μl pufera za uzorke (2% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8), 5% β -merkaptoetanol i 8,8% glicerol). Zatim je talog vorteksovao i zagreva na 100°C, 10 min. Nakon zagrevanja uzorak je centrifugiran (9300xg, 2 min, sobna temperatura). Nakon ovakve pripreme uzorak je spreman za nanošenje na gel, elektroforetsko razdvajanje i imunoblot analizu.

3.3.13. Histološka priprema tkiva

3.3.13.1. Histološka priprema tkiva za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju

Isečki tkiva jetre fiksirani u Bouen-ovom rastvoru (48 h), dehidratirani su rastućim koncentracijama etanola (30%, 50%, 70%, 96% i 100%); prosvetljavani ksilolom; ukalupljeni u parafin i sečeni na kliznom mikrotomu marke Leica (Germany) pri debljini histoloških rezova od 5 μm . Od svakog kalupa isečen je odgovarajući broj susednih preseka tkiva, koji su korišćeni za dalje analize.

3.3.13.1.1. Hematoksilin-eozin (HE) bojenje histoloških preparata

Za prikazivanje strukturnih promena u morfologiji jetre i prisustva nekroze korišćenja je metoda hematoksilin-eozin bojenja. Hematoksilin je bazna (pozitivna) boja koja vezuje bazofilne supstance (DNK, RNK) i daje tamno plavo ili ljubičasto obojenje. Eozin je kisela (negativna) boja koja se vezuje za acidofilne supstance (proteini) i daje crveno ili roze obojenje.

Nakon deparafinizacije histoloških preparata u ksilolu, i rehidracije u seriji etanola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%), preparat je ostavljen u vodi do obezbojavanja. Zatim se preparat boji u rastvoru hematoksilina 5 min, ispere vodom i boji u rastvoru eozina 5 min. Nakon toga se vrši dehidracija u seriji etanola rastuće koncentracije i ksilolola i montira se pokrovno staklo. Za vizuelizaciju je korišćen svetlosni mikroskop marke Opton (Zeiss, Germany)

Stepen degeneracije ćelija jetre i nekroze određivan je po metodi Lobenhofer-a i sar. (2006): 1 – minimalne promene (manje od 5% ćelija), 2 – umerene promene (5-25% ćelija), 3 – jake promene (26-50% ćelija) i 4 – intenzivne promene (preko 50% ćelija).

3.3.13.1.2. Kolokalizaciona analiza histoloških preparata

Za prikazivanje prostornog preklapanja dva proteina obeleženih različitim fluoroforima, koje imaju različite talasne dužine emisije, korišćena je metoda kolokalizacije koja je vizualizovana korišćenjem konfokalnog mikroskopa.

Histološki preparati su blokirani sa 2% goveđim serum albuminom (BSA) u puferu fosfatnih soli (PBS: 137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, preparati su inkubirani sa zečijim Beklin1 i mišijim HMGB1 primarnim antitelom (razblaženje 1: 500 u 0,5 % BSA u PBS-u) preko noći na 4°C. Tkivni preseci su nakon toga isprani tri puta sa PBS-om i inkubirani, u mraku, sa sekundarnim antitelima (Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (H + L) i Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L), LifeTechnologies), razblaženim 1:1000 u 0,5% BSA u PBS-u, dva h na sobnoj temperaturi. Preparati su zatim isprani tri puta PBS-om i prelivevi polivinil alkoholom (Mowiol- Sigma Aldrich, 81381). Vizuelizacija je izvršena na Leica TSC SP8 konfokalnom mikroskopu (Leica

Microsystems) koji je opremljen sa 488/522 nm laserom i 63/1.4 NA imerzionim sočivima. Analiza kolokalizacije obavljena je u ImageJ softveru (NIH, USA) i stepen kolokalizacije između Beklin1 i HMGB1 proteina je meren pomoću Pirsonovog koeficijenta korelacije (PCC). PCC meri snagu linearne veze između intenziteta fluorescencije dveju slika i na osnovu toga im dodeljuje vrednost od 1 (savršena pozitivna korelacija) do -1 (savršena inverzna korelacija), sa 0 vrednošću koja predstavlja nasumičnu distribuciju. (Manders i sar., 1992).

3.3.13.2. Histološka priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju

Isečki tkiva jetre, veličine 1 x 1mm fiksirani su u rastvoru 2.5% glutaraldehydu u 100 mM Sorensovom fosfatnom puferu (pomešati 71,5 ml 100 mM Na₂HPO₄ i 28,5 ml 100 mM KH₂PO₄ kako bi se dobio pH 7,2); dodatno fiksirani u rastvoru 2% osmijum tetrahidroksida u 0,1M Sorensovom fosfatnom puferu; dehidrirani rastućim koncentracijama etanola (30%, 50%, 70%, 96% i 100%) i uronjeni u Araldit (Fluka, Nemačka). Ultra tanki preseći dobijeni su sečenjem na Leica UC6 mikrotomu (Leica Microsystems, Nemačka) pomoću dijamantskih noževa (Diatome). Ultra tanki preseći su zatim optočeni u bakarnu mrežu i kontrastirani pomoću uranil acetata i olovo II acetata (Leica EM STAIN, Leica Microsystems, Nemačka).

Preseći su ispitani na Philips CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu. (Philips/FEI, Holandija) opremljenim sa digitalnom kamerom SIS Mega View III (Olympus Soft Imaging Solutions, Nemačka).

3.3.14. In vivo detekciju apoptoze korišćenjem Apo-TRACE molekula

Apo-TRACE je mali, netoksični, organski molekul koji spada u ApoSense familiju komponenti male molekulske mase, koje se koriste za vizualizaciju ćelijske smrti *in vivo*. ApoSense komponente prepoznaju promene u potencijalu ćelijske membrane i rearanžman u njenim fosfolipidima, što su glavne karakteristike apoptoze u ćelijama. Nakon ubrizgavanja *in vivo*, ApoSense komponente se akumuliraju u citoplazmi apoptotskih ćelija. Fluorescentno obeležen Apo-TRACE molekul se ekscitira na 328 nm a emituje fluorescenciju na 563 nm.

Za in vivo detekciju apoptoze u jetri kontrolnih i pacova sa dijabetesom, u prisustvu ili odsustvu melatonina, korišćen je komercijalno nabavljen komplet (Apo-TRACE In Vivo Apoptosis Detection Kit , CS1120, Sigma-Aldrich). U po 5 pacova iz ispitivanih eksperimentalnih grupa, je intravenozno injeciran otopljen Apo-TRACE rastvor (110 mg/kg), i nakon 2 h životinje su žrtvovane. Po žrtvovanju, izolovane jetre su brzo obavijene aluminijumskom folijom da bi se zaštitile od svetlosti i zamrzavane su u tečnom azotu jedan h. Jetre su potom čuvane na -80°C, minimum 16 h pre dalje preparacije za vizualizaciju. Nakon toga su se zamrznute jetre sekle na 5 μ M i isecci su postavljani na mikroskopsko staklo i prekriveni pokrovnim staklom Tako pripremljeni preparati su analizirani pod fluorescentnim mikroskopom (Zeiss Axiovert fluorescence microscope, Sjedinjene Američke države), opremljenim sa kamerom i objektivom (EC Plan-Apochromat).

3.3.15. Statistička obrada podataka

Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm statistička greška. Razlika između odgovarajućih srednjih vrednosti određena je pomoću jednostrane ANOVE sa post-hoc Mann-Whitney U testom. P vrednosti manje od 0,05 su se smatrale statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Protektivni efekti tretmana melatoninom ili etil piruvatom kod pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom

4.1.1. Preživljavanje životinja

Procenat preživljavanja Wistar pacova tokom perioda od četiri nedelje nakon indukcije dijabetesa jednokratnim injeciranjem STZ u dozi od 65 mg/kg telesne mase iznosio je 78%. Svakodnevni tretman dijabetičnih pacova melatoninom (0,2 mg/kg) ili etil piruvatom (80 mg/kg) pokazao je 100% preživljavanje tokom ispitivanog perioda.

4.1.2. Uticaj melatonina i etil piruvata na održavanje telesne mase i težine jetre kod pacova sa dijabetesom

U **Tabeli 3.** prikazane su promene telesne mase i težine jetre (izražene kroz apsolutnu (g) i relativnu (% od telesne mase) vrednost kontrolnih i dijabetičnih pacova nakon tretmana melatoninom ili etil piruvatom. Tretman kontrolnih grupa pacova melatoninom ili etil piruvatom nije doveo do značajnih promena ni u jednom od merenih parametara (**Tabela 3.**). U poređenju sa kontrolnim pacovima, dijabetes dovodi do pada telesne mase pacova za oko 46% ($p < 0,05$), smanjenja apsolutne težine jetre za oko 30% ($p < 0,05$), i do uvećanja relativne težine jetre 1,3 puta ($p < 0,05$). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do manjeg pada telesne mase (30%, $p < 0,05$), manjeg smanjenja apsolutne težine jetre (17%, $p < 0,05$) i blagog uvećanja relativne težine jetre u poređenju sa kontrolnim pacovima. Tretman dijabetičnih pacova etil piruvatom karakteriše manji pad telesne mase (19,5%, $p < 0,05$) i nepromenjena relativna težina jetre u poređenju sa kontrolnim vrednostima, dok je apsolutna težina jetre i dalje smanjena za oko 30% ($p < 0,05$).

Tabela 3. Promene telesne mase i težine jetre pacova sa dijabetesom, tretiranih melatoninom ili etil piruvatom

	K	K+M	K+EP	D	D+M	D+EP
TELESNA MASA (g)	345±15	340±6	347±11	185±10 ^a	242± ^{a,b}	278,1±6 ^{a,b}
APSOLUTNA TEŽINA JETRE (g)	12,3±0,9	12,2±0,8	12,79±0,6	8,6±0,3 ^a	10,3±0,7 ^{a,b}	8,71±0,8 ^a
RELATIVNA TEŽINA JETRA (%)	3,5±0,1	3,5±0,1	3,7±0,2	4,6±0,2 ^a	4,2±0,2 ^a	3,13±0,3 ^b

Telesna masa i težina jetre su određivane na kraju četvrte nedelje od tretmana sa STZ, pri čemu je težina jetre predstavljena kao apsolutna (g) i relativna (% od telesne mase). K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.1.3. Uticaj melatonina i etil piruvata na nivo insulina i glukoze

U okviru kontrolnih grupa, tretman melatoninom ili etil piruvatom nije doveo do značajnih promena u koncentraciji glukoze i insulina. Dijabetes je praćen padom koncentracije insulina za oko 68% ($p < 0,05$) i sa više od šestostrukim povećanjem nivoa glukoze u krvi (oko 6,3 puta, $p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti (Tabela 4.). Tretman melatoninom nije značajno uticao na ove promene. Tretman dijabetičnih pacova etil piruvatom doveo je samo do manjeg pada koncentracije insulina (za oko 50%, $p < 0,05$).

Tabela 4. Promene koncentracija insulina i glukoze u serumu pacova sa dijabetesom tretiranih melatoninom ili etil piruvatom

	K	K+M	K+EP	D	D+M	D+EP
INSULIN (pmol/l)	1646,8±81	1698±76	1609±73	526,3±22 ^a	585,3±28 ^a	823,4±53 ^b
GLUKOZA (mmol/l)	5,8±0,2	5,1±0,3	5,6±0,5	34,7±3,2 ^a	29,4±1,8 ^a	29,1±2,7 ^a

K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.1.4. Uticaj melatonina i etil piruvata na vrednosti serumskih markera oštećenja jetre

Serumske vrednosti dve za jetru specifične transaminaze, ALT i AST, koriste se kao serumski markeri oštećenja/inflamacije jetre. U **Tabeli 5.** prikazane su vrednosti serumskih aminotferaza kod kontrolnih i dijabetičnih pacova, kao i kod kontrolnih i dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom ili etil piruvatom. Tretman kontrolnih pacova melatoninom ili etil piruvatom nije doveo do značajnih promena ni u jednom od merenih parametara. U serumu dijabetičnih pacova uočeno je statistički značajno uvećanje vrednosti obe transaminaze u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti. Vrednost ALT je povećana 3,5 puta ($p < 0,05$), a AST 2,4 puta ($p < 0,05$). Tretman dijabetičnih pacova i melatoninom i etil piruvatom doveo je do značajnog smanjenja aktivnosti prisustva obe transaminaze. Specifična enzimaska aktivnost ALT je pala za oko 43% ($p < 0,05$) u obe tretirane dijabetične grupe. Melatonin je kod dijabetičnih pacova izazvao pad AST vrednosti za 39% ($p < 0,05$), a etil piruvat za 53% ($p < 0,05$). Dobijene ALT I AST vrednosti nakon ispitivanih tretmana nedvosmisleno ukazuju na poboljšanje opšteg stanja jetre pacova sa dijabetesom.

Tabela 5. Promene specifičnih aktivnosti aminotransferaza AST i ALT u serumu kod dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom ili etil piruvatom

	K	K+M	K+EP	D	D+M	D+EP
ALT (U/l)	49,3±2,7	48,6±2,5	58,4±2,5	171,5±6,4 ^a	93,5±11 ^{a,b}	98,7±13 ^{a,b}
AST (U/l)	186,7±18,4	189,3±12,2	223,7±10	451,2±22 ^a	275,5±13 ^b	211,1±15 ^b

K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, p<0,05 u poređenju sa kontrolnom grupom; b, p<0,05 u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.1.5. Antioksidativan efekat melatonina u jetri pacova sa dijabetesom

Tokom dijabetesa hiperglikemija dovodi do povećanja produkcije ROS i pada aktivnosti antioksidativnih enzima što dovodi do pojave oksidativnog stresa. Kako je antioksidativna aktivnost melatonina poznata, ispitan je njegov efekat na oksidativni status jetre pacova sa dijabetesom. Ovaj efekat je najpre praćen preko promena u koncentraciji O^{2-} , H_2O_2 , nivoa lipidne peroksidacije, a potom i preko promena u aktivnosti antioksidativnih enzima.

4.1.5.1. Uticaj melatonina na nivo O^{2-} , H_2O_2 i TBARS

O^{2-} važi za “primarni” radikal koji interagujući sa drugim molekulima generiše “sekundarne“ reaktivne kiseonične vrste. U jetri dijabetičnih pacova koncentracija O^{2-} je uvećana 2,8 puta (p<0,05) u odnosu na kontrolni nivo (**Tabela 6.**). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do smanjenja nivoa O^{2-} u jetri za oko 32% (p<0,05). H_2O_2 je reaktivna kiseonična vrsta, koja u ekstraćelijskoj sredini može ući u Fentonovu reakciju gde se kao produkt reakcije dobija visoko reaktivni hidroksil radikal, koji reagujući sa makromolekulima uzrokuje njihova oštećenja. U jetri pacova sa dijabetesom koncentracija H_2O_2 raste 2,2 puta (p<0,05) u odnosu na kontrolne vrednosti (**Tabela 6.**). Tretman dijabetičnih pacova sa melatoninom dovodi do smanjenja koncentracije H_2O_2 za 30% (p<0,05).

Kako su od svih bioloških makromolekula lipidi najosetljiviji na delovanje reaktivnih vrsta, određivana je TBARS kao pokazatelj nivoa prisutne lipidne peroksidacije (**Tabela 6.**). Koncentracija TBARS je u jetri dijabetičnih pacova bila uvećana 1,5 puta ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne vrednosti, što ukazuje na oksidativne promene lipida koji mogu dovesti do narušavanja integriteta membrana organela i samih ćelija što posledično vodi oštećenju jetre. Tretman dijabetičnih pacova melatoninom je značajno umanjio koncentraciju TBARS dovodeći je na kontrolni nivo (**Tabela 6.**).

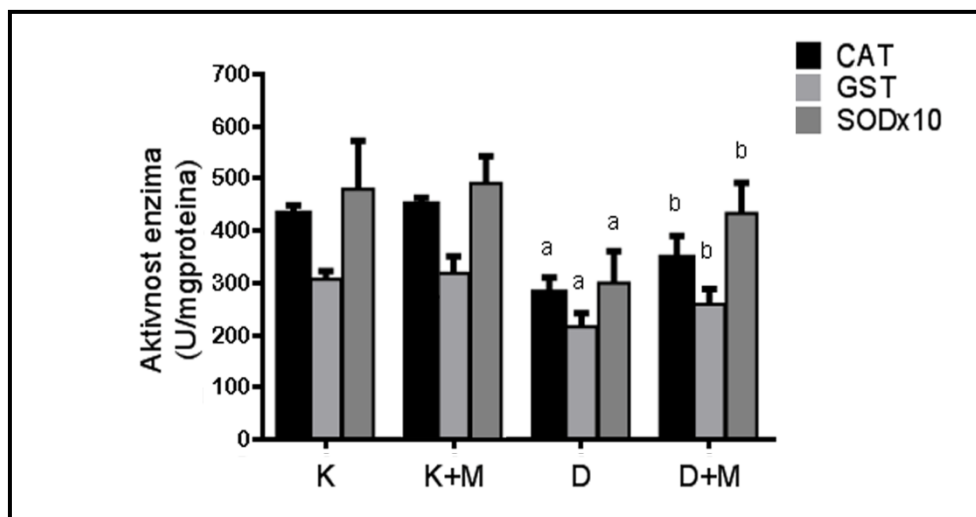
Tabela 6. Vrednosti koncentracija O_2^- , H_2O_2 i TBARS-a u jetri dijabetičnih pacova i nakon tretmana melatoninom

	K	K+M	D	D+M
O_2^- (nmolNBT/min/mg proteina)	66,5 ±3,5	64,3±2,1	189,4±6,3 ^a	127,7±3,3 ^b
H_2O_2 (nmol/ml)	72,4±4,1	71,9±3,1	159,4±14,5 ^a	108,7±9,1 ^b
TBARS (nmol MDA/mg proteina)	11,2±1,08	10,4±1,4	17,2±1,3 ^a	12,1±0,8 ^b

K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.1.5.2. Uticaj melatonina na aktivnost antioksidativnih enzima

Sa ciljem da se utvrdi stepen antioksidativne zaštite u jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana melatoninom kao antioksidansom, ispitivane su aktivnosti CAT, GST i superoksid dismutaze SOD. U jetri dijabetičnih pacova sva tri ispitivana antioksidativna enzima ispoljavaju pad u aktivnosti (**Slika 24.**). Aktivnost CAT je umanjena za 35% ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne vrednosti, GST za 30% ($p < 0,05$), a aktivnost ukupne SOD za 37% ($p < 0,05$). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom praćen je poboljšanjem aktivnosti antioksidativnih enzima. Aktivnost CAT je uvećana 1,24 puta ($p < 0,05$), GST 1,2 puta ($p < 0,05$) i ukupne SOD 1,4 puta ($p < 0,05$).



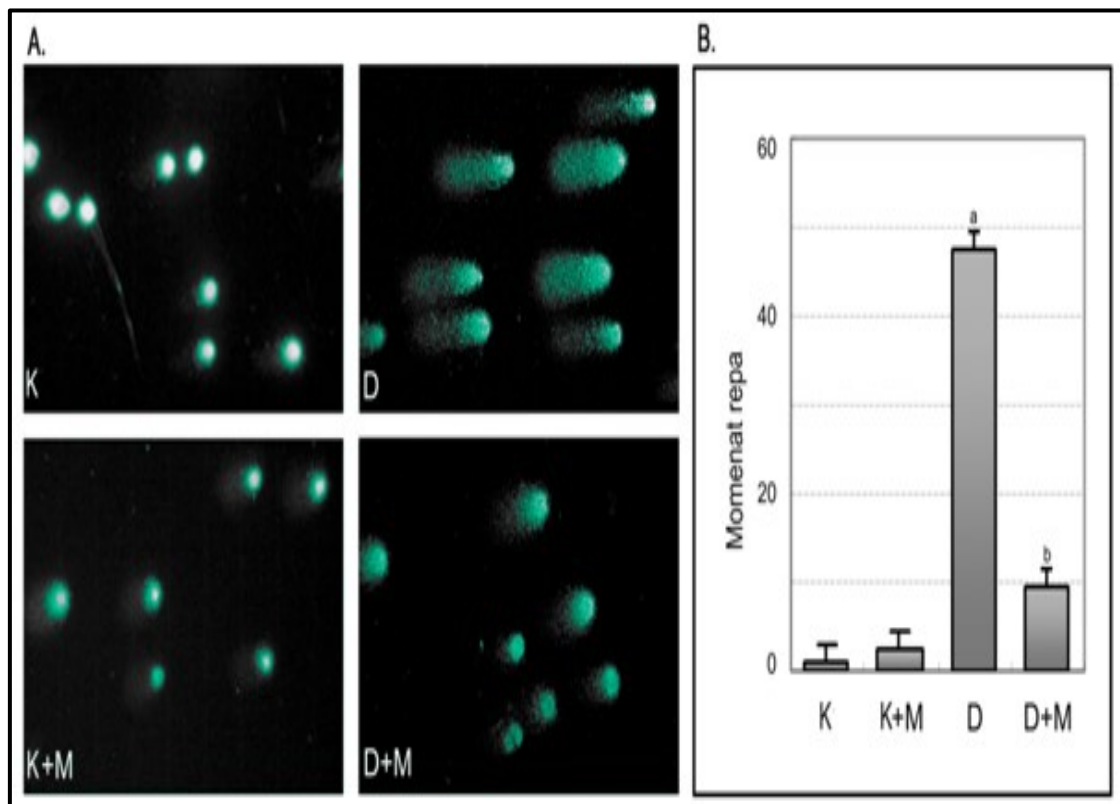
Slika 24. Promene aktivnosti CAT, GST i SOD u jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana melatoninom K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.1.6. Uticaj melatonina na stepen DNK oštećenja u ćelijama jetre pacova sa dijabetesom

Pojačano formiranje i akumulacija ROS u dijabetesu, kao i pad antioksidativne zaštite mogu dovesti do pojave DNK oštećenja. Korišćenjem tzv. komet eseja ispitivan je stepen DNK oštećenja u ćelijama jetre dijabetičnih pacova i promene koje nastaju tokom tretmana melatoninom (**Slika 25.**).

Tokom elektroforetskog razdvajanja, oštećeni DNK fragmenti putuju iz jedra u pravcu katode (u smeru struje) čime se formiraju strukture koje podsećaju na komete. Količina DNK prisutna u repu komete, ukazuje na intenzitet DNK oštećenja. Uočava se da je najveći broj ćelija jetri kontrolnih pacova i kontrolnih pacova tretiranih melatoninom bio bez repa komete (**Slika 25A.**). Na osnovu ovog podatka može se zaključiti da u ovim ćelijama nema DNK oštećenja. Kod ćelija jetri pacova sa dijabetesom velika količina DNK nalazila se u repu komete što ukazuje na visok nivo dvolančanih prekida na DNK. Analizom momenta repa komete, koji predstavlja proizvod dužine repa i procenta DNK u repu komete, uočeno uvećanje DNK oštećenja u dijabetičnoj jetri je 47 puta ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim ćelijama (**Slika 25B.**). Smanjenje oksidativnog stresa melatoninom značajno je smanjio količinu DNK u repu

kometa ćelija jetri dijabetičnih pacova odnosno smanjuje DNK oštećenja. Analiza momenta repa ukazuje da je ovo DNK oštećenje smanjeno za 77% ($p < 0,05$).

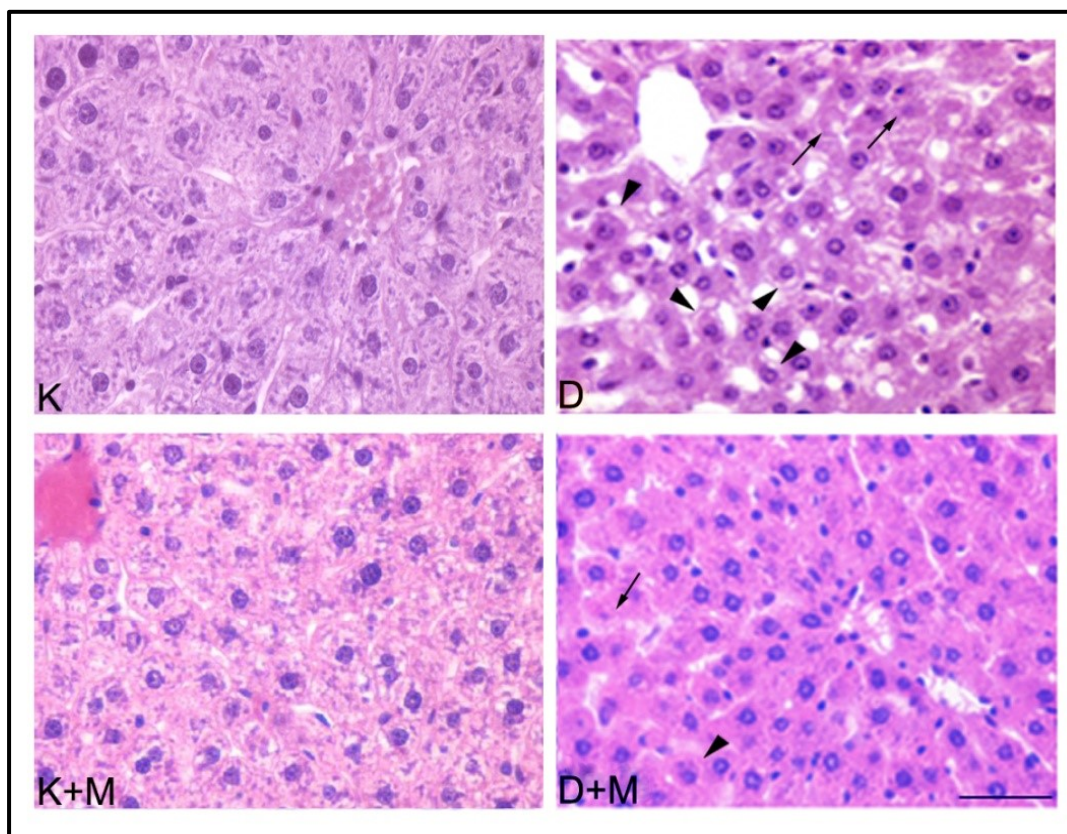


Slika 25. DNK oštećenja u jetri pacova sa dijabetesom i efekat melatonina **A.** Reprezentativne slike DNK oštećenja utvrđene pomoću komet eseja. **B.** Procena DNK oštećenja korišćenjem momenta repa kao parametra DNK oštećenja. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška momenta repa kometa dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.2. Prisutvo nekroze i vanćelijskog HMGB1 proteina u jetri dijabetičnih pacova

4.2.1. Utvrđivanje prisustva nekroze histološkom analizom preseka tkiva jetre

Ukoliko oksidativni stres dovede do takvih oštećenja DNK i drugih makromolekula da su ćelijski odbrambeni mehanizmi nadjačani oštećenjima, dolazi do ćelijske smrti nekrozom ili apoptozom (Asmat, 2016). Kod dijabetičnih pacova uočeno je odstupanje u organizaciji tkiva jetre. Na presecima tkiva jetre dijabetičnih pacova koji su tretirani melatoninom ovakva odstupanja su umanjena, a normalna struktura jetre je očuvana (Slika 26.).



Slika 26. Preseci tkiva jetre pacova. Reprezentativne slike preseka tkiva jetre. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. ↗, nekroza; ►, degeneracija ćelija jetre. Uvećanje x400.

Histološkom analizom utvrđeno je da su najuočljivije promene u jetri dijabetičnih pacova hidropsna degeneracija ćelija (stepen 4, oštećenje>50%) i prisustvo nekroze (stepen 2, zastupljenost nekroze 5-25%). Hidropsna degeneracija nastaje usled poremećaja u propustljivosti ćelijske membrane nastale oštećenjem u lipidnom dvosloju kada dolazi do nekontrolisanog ulaska vode i Na⁺ što se manifestuje bubrenjem ćelije. Ove promene su karakteristične za ćelije predodređene za nekrotsku smrt. Prisutne nekroze se manifestuju kao karioliza, koja je više izražena, i karioreksa. Karioliza predstavlja potpunu dezintegraciju jedra umiruće ćelije usled enzimske degradacije endonukleazama (Lobenhofer i sar., 2006). Nakon kariolize cela ćelija se uniformno boji eozinom. Karioreksa se definiše kao destruktivna fragmentacija jedra umiruće ćelije u kojima se nakon ovog procesa hromatin neravnomerno raspoređuje po citoplazmi. Nekroze su u ćelijama jetre fokalne, jasno ograničene na mesta žarišta nekroze, i difuzno raspoređene bez posebne mikroanatomske lokalizacije. Tretman dijabetičnih pacova sa melatoninom smanjuje stepen hidropsne degeneracije ćelija jetre na 1 (<5%) kao i procenat nekroznih ćelija na manje od 5% (**Tabela 7.**). Ovo ukazuje na postojanje jasne korelacije između stepena oksidativnog stresa i nivoa degenerativnih promena u ćeliji koje rezultuju njenom smrću.

Tabela 7. Stepen hidropsne degeneracije ćelija jetre pacova i nekroze u uslovima dijabetesa i tretmana melatoninom

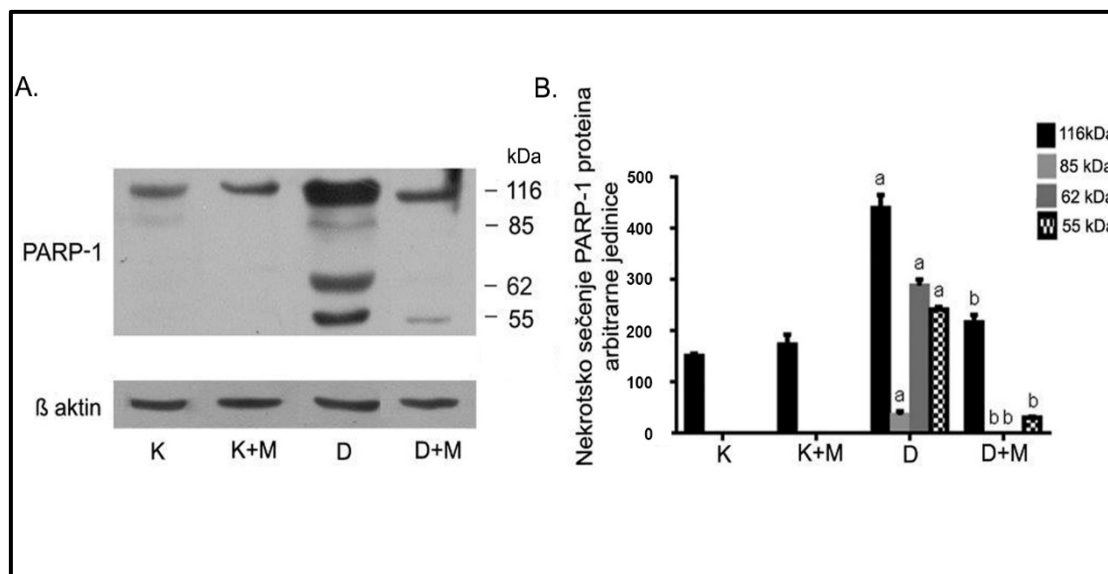
	K	K+M	D	D+M
Degeneracija ćelija jetre	1	1	4	1
	<5%	<5%	>50%	<5%
Nekroza	0	0	2	1
	0%	0%	5-25%	<5%

Promene su određivane po metodi Lobenhofer i sar. (2006) : 1 – minimalne promene (manje od 5% ćelija), 2 – umerene promene (5-25% ćelija), 3 – jake promene (26-50% ćelija) i 4 – intenzivne promene (preko 50% ćelija). K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom.

4.2.2. Imunoblot analiza PARP-1 proteina kao molekularnog markera nekroze, u ćelijama jetre pacova sa dijabetesom

Tokom nekroze dolazi do aktivacije proteaza i selektivne proteolize pojedinih ciljnih proteina. Profil degradacije određenih proteina može da ukaže na tip ćelijske smrti. Kako tokom oksidativnog stresa dolazi do DNK oštećenja, nastali prekidi u DNK lancu dovode do aktivacije PARP-1 proteina u cilju popravke nastalog oštećenja (de Murcia i sar., 1994). Međutim, u situaciji kada je stepen DNK oštećenja veliki, dolazi do preterane aktivacije PARP-1 proteina što dovodi do energetske kolapsa u ćeliji i posledično do nekrotske smrti. U ćelijama kod kojih je aktivirana nekroza, PARP-1 pokazuje specifičan obrazac degradacije na proteolitičke, tzv. „nekrotske“ fragmente, čije su molekulske mase 55 kDa i 62 kDa. Sa ciljem da se dodatno ispita prisutnost nekroze i na molekularnom nivou, analiziran je PARP-1 protein i obrazac njegovog sečenja u jetri dijabetičnih pacova.

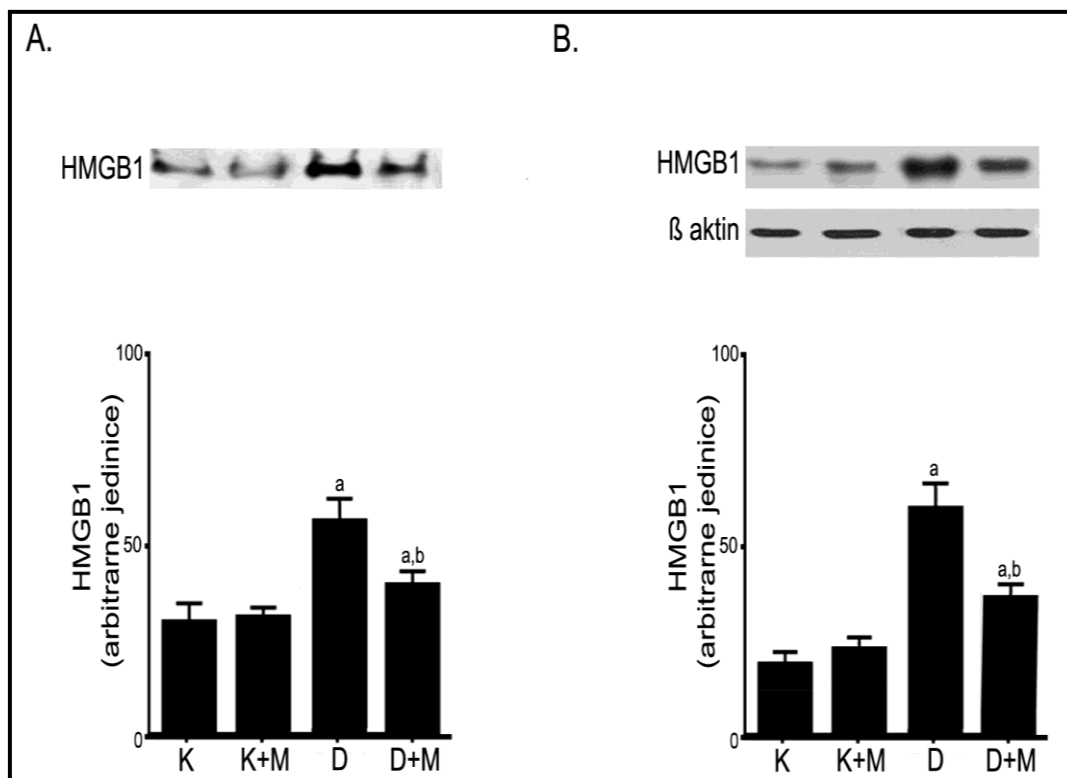
U poređenju sa kontrolnim pacovima, imunoblot analizom homogenata jetre dijabetičnih pacova detektovano je uvećano prisustvo (2,9 puta, $p < 0,05$) intaktnog PARP-1 proteina na poziciji molekulske mase od 116 kDa (**Slika 27A.**). Takođe, detektovano je prisustvo fragmenata PARP-1 proteina na poziciji molekulskih masa od 55 kDa i 62 kDa koji nisu detektovani kod kontrolnih životinja, i fragment na poziciji molekulske mase 85 kDa. Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do značajnog smanjenja relativnog prisustva intaktnog PARP-1 proteina (za 50% u odnosu na dijabetičnu grupu, $p < 0,05$) kao i do smanjenja prisustva nekrotskih PARP-1 fragmenata. Prisustvo PARP-1 fragmenta od 55 kDa je smanjeno za 80% ($p < 0,05$), dok fragment od 62 kDa nije detektovan (**Slika 27B.**) Ovi rezultati su ukazali na to da snižavanje stepena oksidativnog stresa tretmanom melatoninom umanjuje stepen nekrotske ćelijske smrti, kao što je pokazala i histološka analiza jetre.



Slika 27. Imunoblot analiza proteina homogenata jetre pacova na prisustvo PARP-1 nekrotskih fragmenata p55 i p62 (A) sa grafikim prikazom rezultata njihove kvantifikacije (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.2.3. Imunoblot analiza HMGB1 proteina kao molekularnog markera nekroze u jetri pacova sa dijabetesom

Ukoliko je ćelija umrla nekrozom, iz nje se u vanćelijsku sredinu oslobođen sadržaj koji uključuje i tzv. markere nekroze kojima pripada i HMGB1 protein. Metodom imunoblot analize seruma dijabetičnih pacova detektovano je 2,2 puta ($p < 0,05$) veće prisustvo HMGB1 proteina u odnosu na serum kontrolnih pacova (**Slika 28A.**). Tretman melatoninom nije značajno uticao na relativni nivo HMGB1 proteina u serumu kontrolne grupe. Tretman dijabetičnih pacova melatoninom smanjio je nivo HMGB1 proteina u serumu za 30% ($p < 0,05$). Imunoblot analizom homogenata jetre dijabetičnih pacova (**Slika 28B.**) detektovano je uvećenje prisutnosti HMGB1 proteina za oko 2,4 puta ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom pacova. Tretman kontrolne grupe melatoninom nije značajno uticao na nivo HMGB1 proteina u homogenatu jetre dok je tretman dijabetičnih pacova melatoninom smanjio nivo prisutnog HMGB1 proteina za 35% ($p < 0,05$).



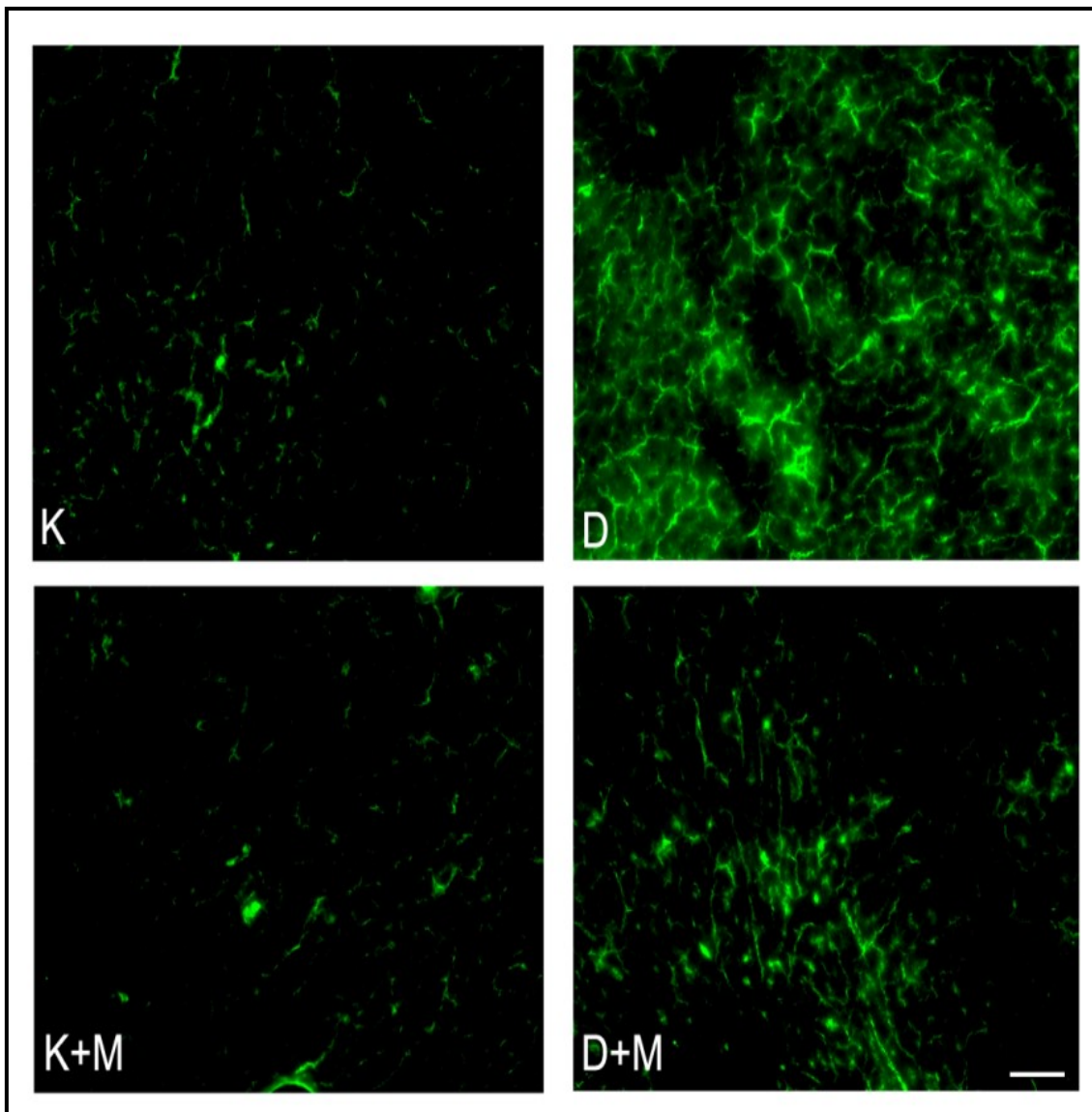
Slika 28. Imunoblot analiza seruma (A) i homogenata jetre pacova (B) na prisustvo HMGB1 proteina sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena. Rezultati kvantifikacije su dobijeni iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljeni su kao srednja vrednost. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.3. Prisustvo apoptoze u ćelijama jetre dijabetičnih pacova i uloga HMGB1 proteina u regulaciji ovog procesa

4.3.1. *In vivo* detekcija prisustva apoptoze u jetri pacova sa dijabetesom

Za analizu prisustva apoptoze u jetri pacova sa dijabetesom korišćen je fluorescentno obeležen Apo-Trace molekul koji ima sposobnost da prepozna apoptotsku ćeliju i akumulira se u njenoj citoplazmi. Analizom histoloških preparata tkiva jetre iz pacova kojima je *in vivo* injeciran Apo TRACE pokazano je da u kontrolnim uzorcima i uzorcima iz pacova tretiranih melatoninom, većina ćelija nije bila obojena (**Slika 29**). U preparatima jetre dijabetičnih pacova uočeno je prisustvo velikog broja fluorescentno obojenih ćelija što ukazuje na značajno prisustvo ćelija u apoptozi. U preparatima jetre

dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom, detektovano je značajno smanjenje broja fluorescentno obojenih ćelija u poređenju sa dijabetičnim uzorcima, što govori u prilog tome da smanjenje oksidativnog stresa u dijabetesu ima za posledicu i smanjenje ćelijske smrti apoptozom.



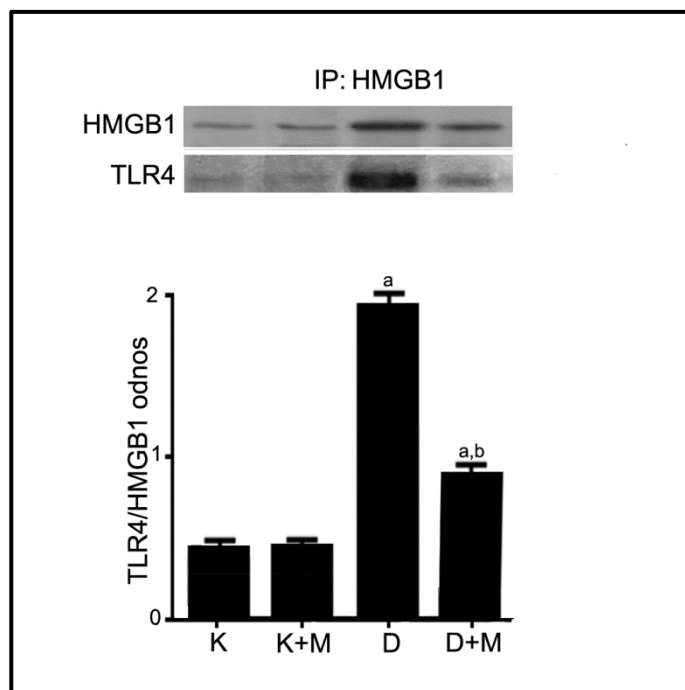
Slika 29. *In vivo* detekcija apoptoze u jetri pacova korišćenjem fluorescentno obeleženog Apo-TRACE molekula. Reprezentativni fluorescentni mikrografi preseka jetre su izabrani iz sve četiri eksperimentalne grupe. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Uvećanjex400, razmer 25 μ m.

4.3.2. Učešće HMGB1 proteina u aktivaciji apoptotske signalizacije u jetri pacova sa dijabetesom

Uvećan nivo HMGB1 proteina u serumu i homogenatima jetre pacova sa dijabetesom, kao i prisustvo nekroze, ukazuju na permanentno oslobađanje HMGB1 proteina u vanćelijsku sredinu tokom dijabetesa, gde posredstvom interakcija sa različitim receptorima, ovaj protein može uticati na određene signalne puteve. Jedan od puteva koji može biti aktiviran HMGB1 proteinom je unutrašnji, mitohondrijalni put apoptoze u ćelijama, preko aktivacije JNK proteina. Ova uloga HMGB1 ostvaruje se preko njegovih interakcija sa TLR4 receptorom. Kako je prisutnost apoptoze u dijabetesu smanjena u uslovima hroničnog tretmana melatoninom, što je u korelaciji i sa smanjenim nivoom HMGB1 proteina u serumu i homogenatima jetre, ova osobina melatonina je iskorišćena za analizu uticaja HMGB1 proteina na aktivaciju apoptotske signalizacije u dijabetesu.

4.3.2.1. Interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 receptorom

U cilju analize učešća HMGB1 proteina u aktivaciji apoptotske signalizacije u dijabetičnoj jetri, najpre su ispitivane njegove interakcije sa TLR4 receptorom. Imunoprecipitovan HMGB1 protein iz jednakih količina ukupnih homogenata jetre pacova podvrgnut je analizi na prisustvo TLR4 korišćenjem metode imunoblota. Kao što se sa **Slike 30.** može videti, interakcije između HMGB1 i TLR4 receptora su 3,8 puta ($p < 0,05$) više zastupljene u jetri pacova sa dijabetesom nego u jetri kontrolnih pacova i pacova tretiranih samo melatoninom. Tretman dijabetičnih pacova melatoninom praćen je padom HMGB1/TLR4 interakcija za 53% ($p < 0,05$) što se može objasniti uočenim smanjenjem prisutnosti HMGB1 proteina u homogenatima jetre.



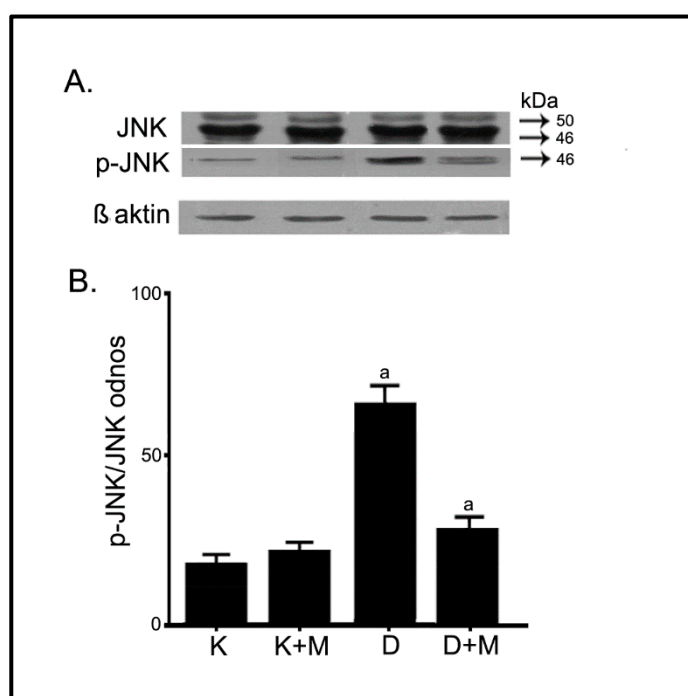
Slika 30. Interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 receptorom. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-HMGB1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-TLR4 antitela. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.3.2.2. Promene u aktivnosti JNK signalnog puta posredovanog HMGB1/TLR4 interakcijama

JNK pripada MAPK familiji kinaza koje su uključene u regulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Da li će aktivacija JNK voditi u proliferaciju ili apoptozu zavisi od tipa ćelije i vrste stimulusa (Sabapathy i sar., 2001). JNK se aktivira fosforilacijom na tirozinu nakon aktivacije različitih receptora, među kojima je i TLR4 (Maedea, 2010). Aktivirana JNK kinaza može uticati i na spoljašnji i na unutrašnji signalni put apoptoze zahvaljujući svojoj sposobnosti da interaguje i moduliše aktivnost različitih pro- i anti-apoptotskih proteina.

Kako bi se ispitala promena u nivou i aktivnosti JNK kinaze u jetri dijabetičnih pacova rađena je imunoblot analiza homogenata jetre sa odgovarajućim antitelima na JNK i fosfo (p)-JNK. Anti-JNK antitelo detektovalo je dve izoforme, molekulske mase 54 kDa i 46 kDa, dok je antitelo naspram p-JNK detektovalo samo izoformu od 46 kDa

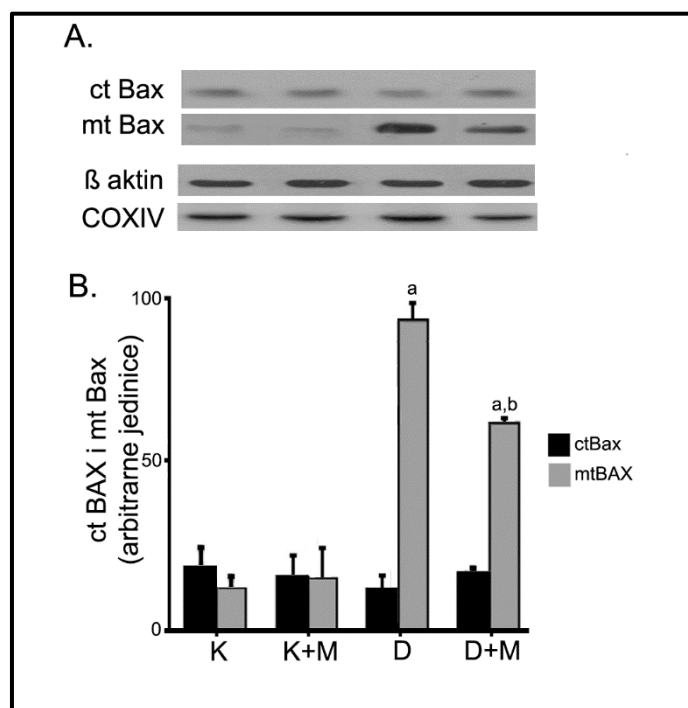
(Slika 31A.). Iako se prisutnost ukupne JNK nije značajno promenila ni u jednoj od četiri ispitivane eksperimentalne grupe, njena aktivnost jeste što se vidi kroz uvećanje odnosa p-JNK/JNK kinaze detektovanog kod dijabetične grupe pacova (Slika 31B.). Aktivnost JNK kinaze je 3,8 puta ($p < 0,05$) veća u jetri pacova sa dijabetesom nego u kontrolnim jetrama. Ovo povećanje aktivnosti JNK kinaze je u korelaciji sa uvećanjem HMGB1/TLR4 interakcija koje takođe iznosi 3,8 puta u dijabetičnoj jetri (Slika 30.). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do značajnog pada u aktivnosti JNK (69%, $p < 0,05$) što je u skladu sa smanjenjem stepena interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 detektovanog kod ove grupe pacova.



Slika 31. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo JNK i p-JNK (A) sa grafičkim prikazom odnosa fosforilisane (p-JNK) i ukupne JNK kinaze (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

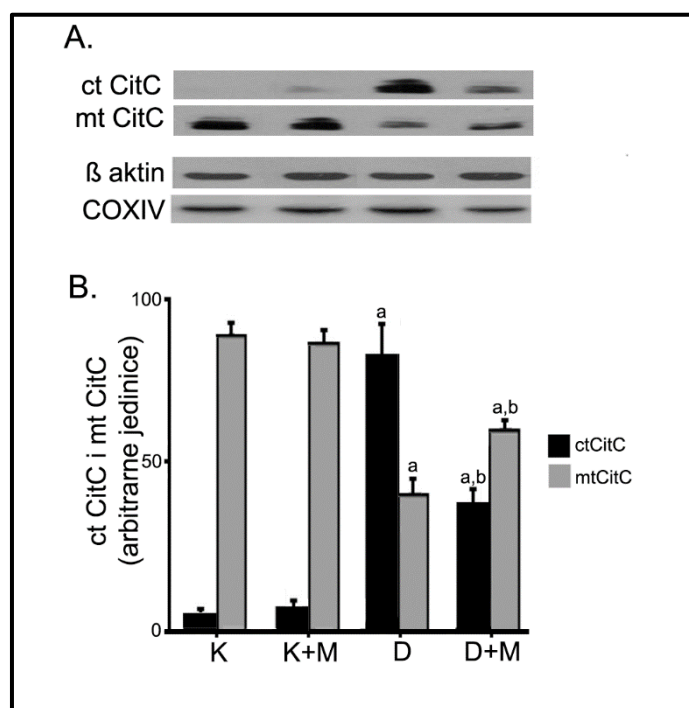
4.3.2.3. Aktivacija mitohondrijalnog puta apoptoze posredovanog HMGB1/TLR4 interakcijama i aktivacijom JNK

Aktivacija JNK igra važnu ulogu u translokaciji proapoptotskog Bax proteina iz citoplazme na mitohondrije, što dovodi do otvaranja mitohondrijalnih pora, oslobađanja citohroma C u citoplazmu, aktivacije odgovarajućih kaspaza i indukcije završne faze apoptoze. Imunoblot analiza citoplazmatske i mitohondrijalne frakcije ćelija jetri dijabetičnih pacova detektovala je 5,9 puta ($p < 0,05$) veće prisustvo Bax proteina u mitohondrijalnoj frakciji ćelija jetre dijabetičnih pacova u poređenju sa kontrolnim vrednostima (Slika 32B.). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do smanjenja translokacije Bax proteina iz citoplazme na mitohondrije (36%, $p < 0,05$), što je u korelaciji sa uočenim smanjenjem HMGB1/TLR4 posredovane aktivacije JNK kinaze kod ovih uzoraka.



Slika 32. Imunoblot analiza proteina citoplazmatske (ct) i mitohondrijalne (mt) frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo Bax proteina (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

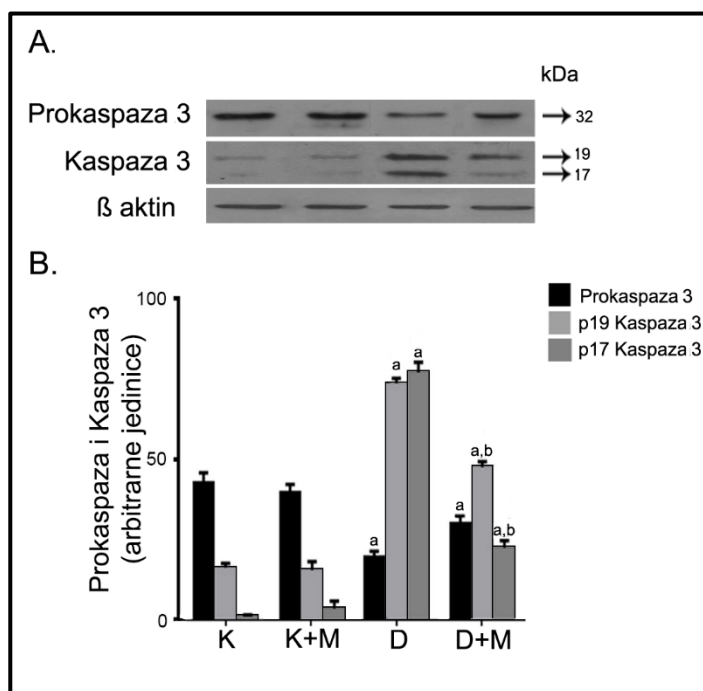
Imunoblot analiza prisustva citohroma C u citoplazmatskoj i mitohondrijalnoj frakciji ćelija jetre pokazala je da tokom dijabetesa dolazi do značajnog oslobađanja citohroma C iz mitohondrija (**Slika 33.**), obzirom da je u citoplazmatskoj frakciji detektovano povećanje nivoa citohroma C od 24 puta ($p < 0,05$) dok je njegova prisutnost u mitohondrijalnoj frakciji smanjena za 53% ($p < 0,05$). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do manjeg oslobađanja citohroma C u citoplazmu (54%, $p < 0,05$) u poređenju sa dijabetičnim pacovima što je u skladu sa smanjenjem translokacije Bax proteina na mitohondrije.



Slika 33. Imunoblot analiza proteina citoplazmatske (ct) i mitohondrijalne (mt) frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo citohroma C, Cit C (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Prisustvo citohroma C u citoplazmi može dovesti do formiranja Apaf-1 kompleksa koji proteolitički seče prokaspazu 3 i prevodi je u aktivnu formu, kaspazu 3, koja je odgovorna za izvršnu fazu apoptoze. Imunoblot analiza homogenata jetre dijabetičnih pacova detektovala je smanjenje prisustva prokaspaze 3 za 55% ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim uzorcima, i uvećanje prisustva aktivne kaspaze 3 (**Slika 34B.**)

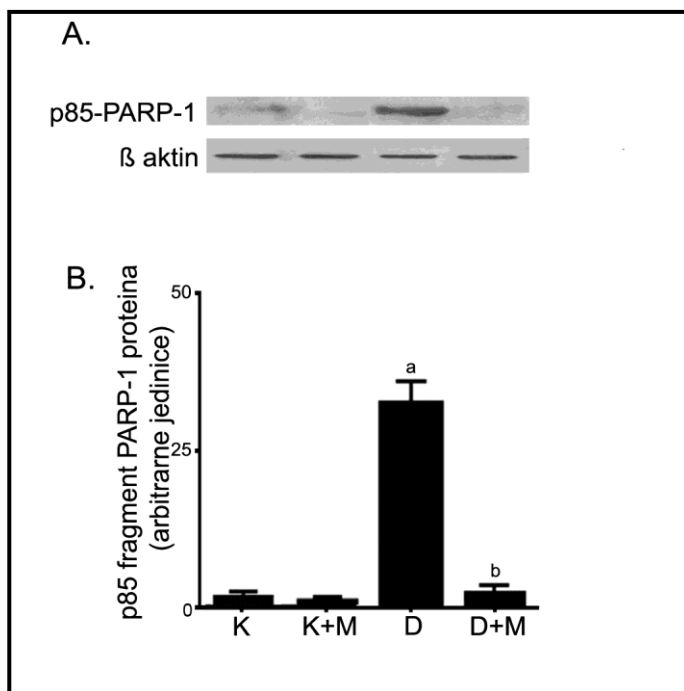
koja se javlja u vidu dve izoforme molekulske mase 17 kDa i 19 kDa. Izoforma od 17 kDa (p17) uvećana je 40 puta ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim vrednostima, a p19 4,5 puta ($p < 0,05$). Tretman dijabetičnih životinja melatoninom smanjuje proteolitičko cepanje prokaspaze, obzirom da je imunoblot analiza detektovala veće prisustvo prokaspaze 3 (1,3 puta, $p < 0,05$) u poređenju sa grupom dijabetičnih pacova, i smanjeno prisustvo ($p < 0,05$) kaspaze 3 izoformi (p17 izoforma je bila smanjena za 71%, a p19 za 31%).



Slika 34. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo prokaspaze 3 i kaspaze 3 (A) sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Kako bi potvrdili aktivnost kaspaze 3 i prisustvo apoptoze, iskoristili smo saznanje da aktivirana kaspaza 3 deaktivira PARP-1 njegovom proteolitičkom degradacijom na fragment molekulske mase 85 kDa, koji je označen kao „apoptotski“. Degradacijom PARP-1 na ovaj način, u ćeliji se sprečava njegova preterana aktivacija. Imunoblot metodom, korišćenjem antitela naspram p85 PARP-1 fragmenta, analizirani su ukupni homogenati jetre pacova (**Slika 35.**). Imunoblot analiza detektovala je slabo

prisustvo ovog fragmenta u homogenatima jetre kontrolnih pacova, sa ili bez tretmana sa melatoninom, i značajno uvećanje prisustva ovog fragmenta (10,7 puta, $p < 0,05$) u homogenatima jetre pacova sa dijabetesom. Kod dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom prisutnost p85 PARP-1 fragmenta bila je na kontrolnom nivou.

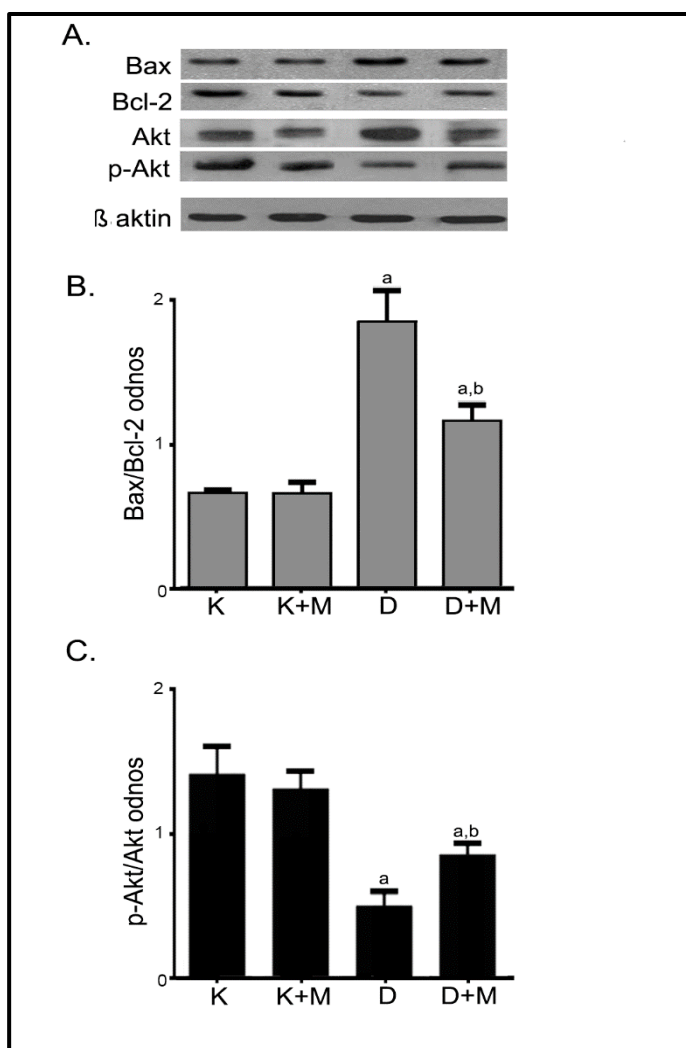


Slika 35. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo apoptoskog p85 PARP-1 fragmenta (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.3.2.4. Analiza odnosa Bax/Bcl2 kao markera prisustva apoptoze

Odvijanje apoptoze karakteriše uvećan odnos pro-apoptotskog Bax i anti-apoptotskog Bcl-2 proteina. Ekspresija gena za Bcl-2 je pod kontrolom Akt kinaze i njome posredovanog signalnog puta; na ovaj način aktivirana Akt je uključena u preživljavanje ćelija u stresogenim uslovima. Akt se aktivira fosforilacijom na serinskim i treoninskim aminokiselinim ostacima i njena aktivacija zavisi i od aktivacije TLR4 receptora.

Imunoblot analiza ukupnih homogenata jetre pacova pokazala je da tokom dijabetesa dolazi do značajnog povećanja prisustva Bax proteina (2 puta, $p < 0,05$) i smanjenja prisustva Bcl-2 proteina za 30% u poređenju sa kontrolom. Ovakvo prisustvo rezultuje u značajno povećanom odnosu Bax/Bcl-2 (2,6 puta, $p < 0,05$) u dijabetičnim uzorcima, što govori u prilog postojanja uvećane prisutnosti apoptoze (**Slika 36B.**). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom smanjuje Bax/Bcl-2 odnos za 35% ($p < 0,05$).



Slika 36. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo Bax, Bcl-2, Akt i p-Akt (A) Grafički prikaz odnosa Bax/Bcl-2 (B) i p-Akt/Akt (C). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

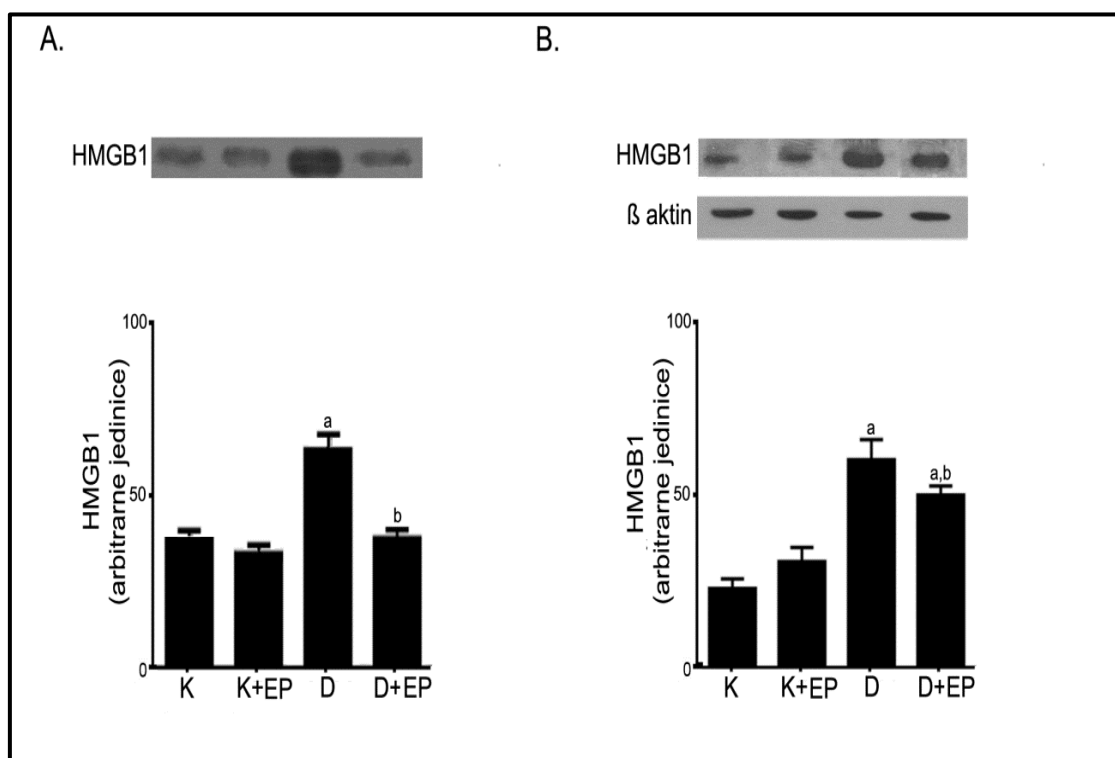
Smanjeno prisustvo Bcl-2 proteina u jetri pacova sa dijabetesom pokušali smo da objasnimo preko aktivnosti Akt kinaze. Imunoblot analiza prisutnosti i aktivacije Akt kinaze u ukupnim homogenatima jetre pacova pokazala je da se prisutnost ukupne Akt nije statistički značajno menjala ni u jednoj od četiri ispitivane eksperimentalne grupe (**Slika 36A.**), iako je detektovan izvestan porast u homogenatima jetre dijabetičnih pacova. Nasuprot skoro neizmenjenoj prisutnosti, imunoblot analiza je detektovala, upoređenju sa kontrolnim vrednostima, smanjenu aktivnosti Akt za oko 50% ($p < 0,05$), u jetri pacova sa dijabetesom prikazanu kroz odnos p-Akt/Akt (**Slika 36B.**). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do manjeg opadanja njene aktivnosti (za 30%) u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Ovi rezultati ukazuju da srazmerno svojoj prisutnosti u vanćelijskoj sredini, interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 receptorom mogu da stišavaju odbrambene kapacitete ćelija koji su posredovani Akt signalnim putem i da favorizuju procese ćelijskog umiranja.

4.3.3. Inhibicija sekrecije HMGB1 proteina etil piruvatom i apoptotska signalizacija u jetri pacova sa dijabetesom

Prikazane promene prisustva i aktivnosti komponenti unutrašnjeg, mitohondrijalnog puta apoptoze jasno korelišu sa prisustvom HMGB1 proteina i njegovim interakcijama sa TLR4 i ukazuju na to da je HMGB1 jedan od učesnika u apoptotskim putevima tokom dijabetesa. Potvrda ovakvom zaključku osnažena je rezultatima dobijenim nakon hroničnog tretmana dijabetičnih pacova sa melatoninom, kada je pokazano da smanjenje nivoa vanćelijskog HMGB1 proteina i njegovih interakcija sa TLR4 prati smanjena aktivacija apoptotskog puta pokrenutog preko JNK kinaze i apoptoze. S obzirom da melatonin smanjuje vanćelijsko prisustvo HMGB1 proteina indirektno, smanjenjem oksidativnog stresa, DNK oštećenja i smrti ćelija nekrozom, da bi se potvrdili dobijeni rezultati i zaključci, dijabetični pacovi su tretirani inhibitorom aktivne sekrecije HMGB1 proteina, etil piruvatom, i praćene su promene u apoptotskoj signalizaciji posredovanoj HMGB1/TLR4 interakcijama.

4.3.3.1. Prisustvo HMGB1 proteina u serumu i jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana sa etil piruvatom

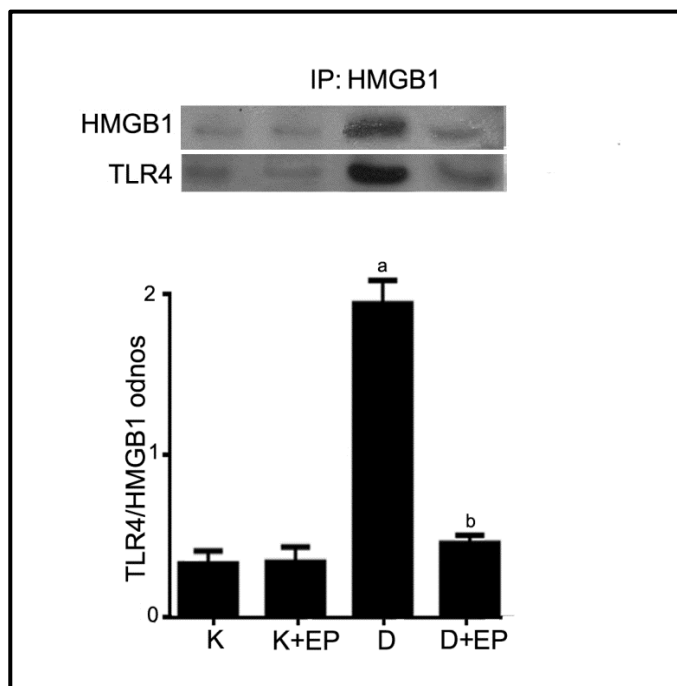
Imunoblot analiza seruma i ukupnih homogenata jetri kontrolnih pacova tretiranih etil piruvatom nije detektovala značajne promene u nivou HMGB1 proteina (Slika 37A., B.). Tretman dijabetičnih pacova etil piruvatom doveo je do smanjenja prisutnosti HMGB1 proteina u serumu za 79% ($p < 0,05$) u poređenju sa dijabetičnom grupom pacova, i do smanjenja nivoa HMGB1 proteina u homogenatima jetre za oko 20% ($p < 0,05$).



Slika 37. Imunoblot analiza seruma (A) i homogenata jetre pacova (B) na prisustvo HMGB1 proteina sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena. Rezultati kvantifikacije su dobijeni iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i predstavljeni su kao srednja vrednost. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.3.3.2. Uticaj etil piruvata na nivo interakcija HMGB1 proteina sa TLR4

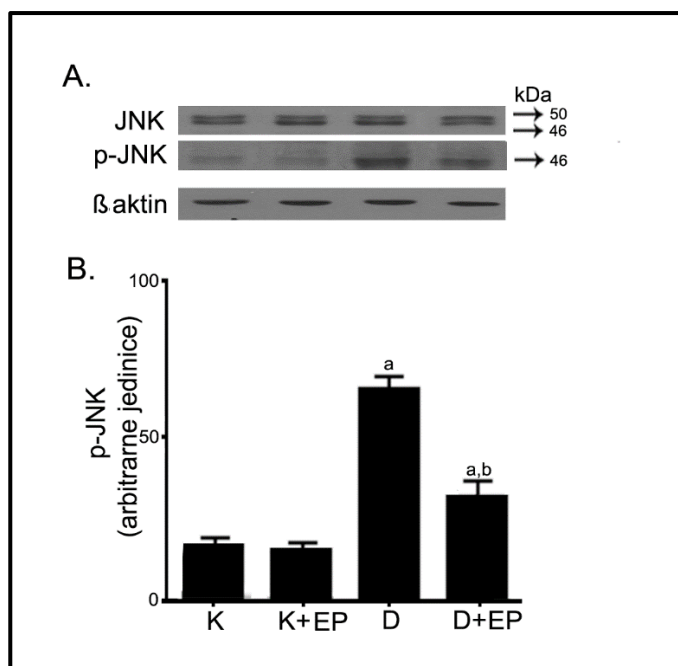
Analiza interakcija HMGB1 proteina sa TLR4 pokazala je da tretman kontrolnih pacova etil piruvatom ne dovodi do promena u nivou HMGB1/TLR4 interakcija, dok kod pacova sa dijabetesom smanjuje njihove interakcije za 71% ($p < 0,05$) (Slika 38.)



Slika 38. Interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 receptorom. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-HMGB1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-TLR4 antitela. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

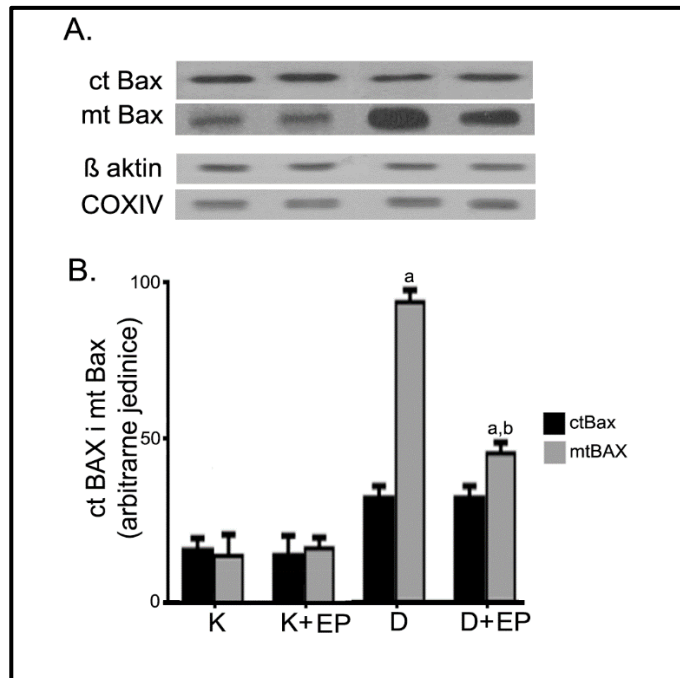
4.3.3.3. Inhibicija HMGB1 sekrecije i promene u aktivnosti JNK signalnog puta apoptoze

Imunoblot analiza ukupnih homogenata jetre sa odgovarajućim antitelima na JNK i p-JNK protein pokazala je da se prisutnost ukupne JNK nije značajno menjala ni kod kontrolnih ni kod dijabetičnih pacova tretiranih etil piruvatom, dok je aktivnost JNK kod dijabetične grupe smanjena za 56%, $p < 0,05$ (Slika 39B.).



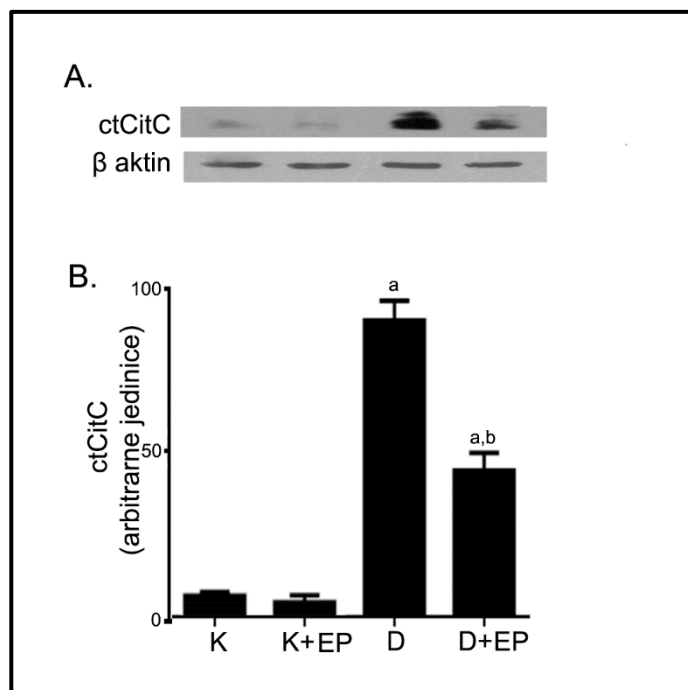
Slika 39. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo JNK i p-JNK (A) sa grafičkim prikazom odnosa p-JNK/JNK (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Imunoblot analiza citoplazmatske i mitohondrijalne frakcije ćelija jetri dijabetičnih pacova na prisustvo Bax proteina (**Slika 40B.**), pokazala je da smanjenje aktivacije JNK prati smanjenje translokacije Bax proteina iz citoplazme na mitohondrije za oko 51% ($p < 0,05$).



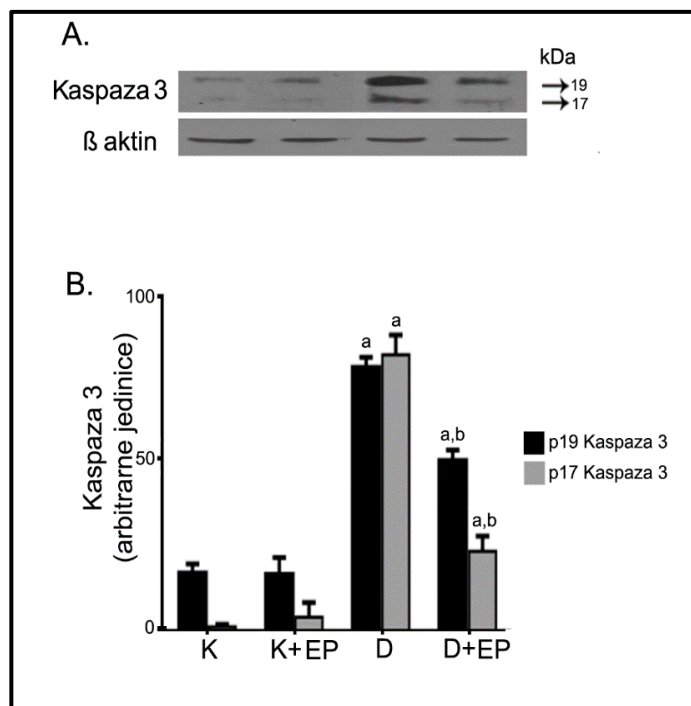
Slika 40. Imunoblot analiza proteina citoplazmatske (ct) i mitohondrijalne (mt) frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo Bax proteina (A) sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Smanjenje prisustva Bax proteina na mitohondrijama ćelija jetri pacova sa dijabetesom, nakon tretmana sa etil piruvatom, ima za posledicu manje oslobađanje citohroma C iz mitohondrija u citoplazmu, što se ogleda u smanjenju prisustva citohroma C u citoplazmatskoj frakciji za oko 50% ($p < 0,05$) u poređenju sa dijabetičnom, netretiranom grupom (**Slika 41B.**)



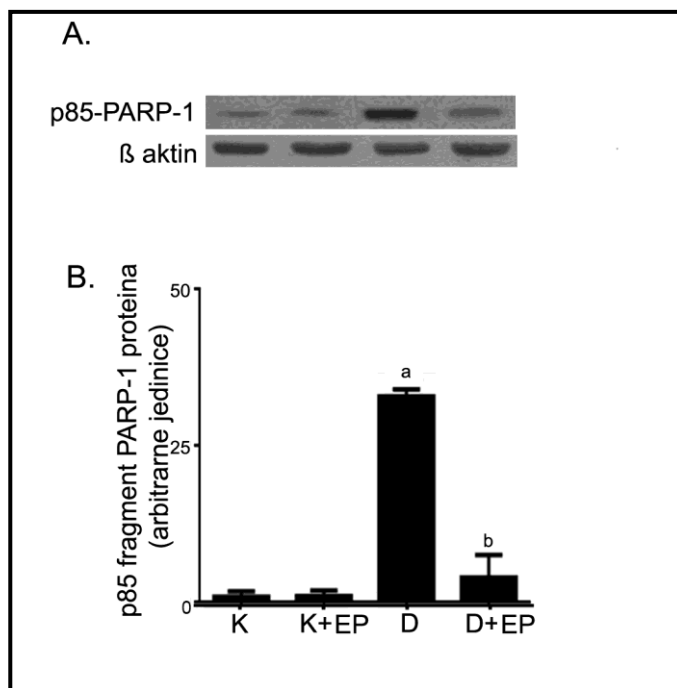
Slika 41. Imunoblot analiza proteina citoplazmatske (ct) frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo citohroma C, Cit C (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Smanjenje u nivou citoplazmatskog citohroma C u citoplazmi ćelija jetre usled tretmana dijabetičnih pacova etil piruvatom dovodi i do smanjenja prisutnosti aktivne forme kaspaze 3 i to p17 za 69% ($p < 0,05\%$), a p19 za 30% ($p < 0,05\%$) (**Slika 42B.**).



Slika 42. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo kaspaze 3 (A) sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

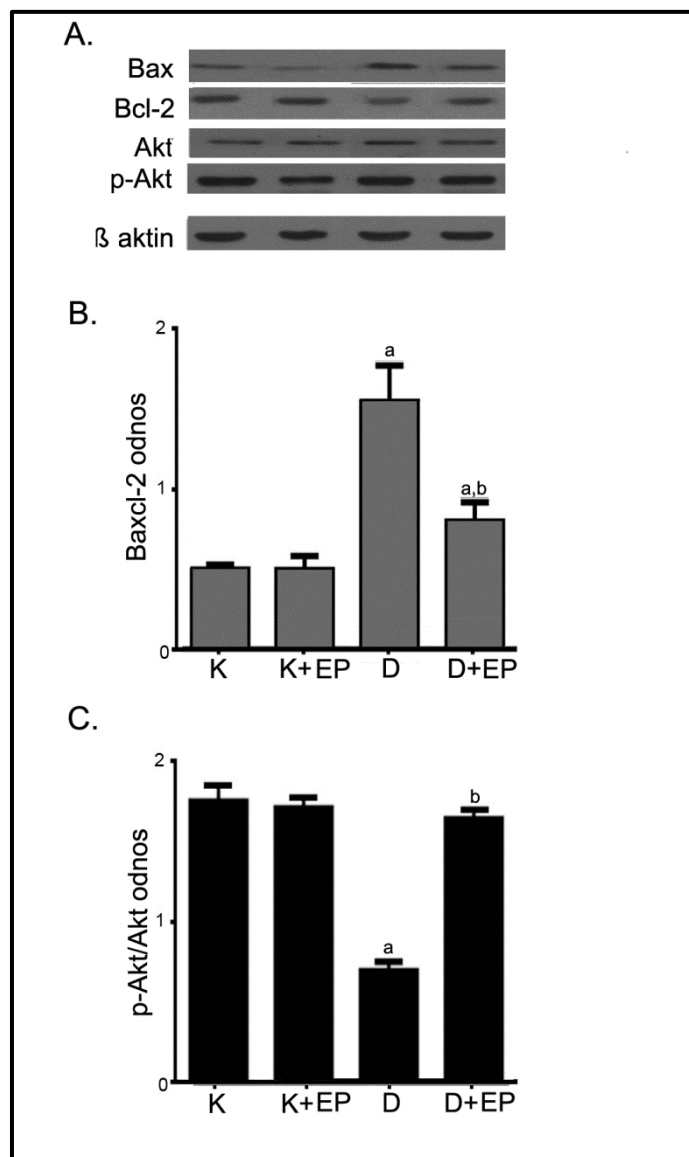
Uticaj kaspaze 3 na izvršenje apoptoze praćen je promenom prisustva p85 PARP-1 apoptotskog fragmenta. Tretman dijabetičnih pacova sa etil piruvatom karakteriše slabo prisustvo p85 fragmenta u ukupnim homogenatima jetre (**Slika 43.**).



Slika 43. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo apoptoskog p85 PARP-1 fragmenta (A) sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.3.3.4. Promene odnosa Bax/Bcl2 u uslovima tretmana pacova sa dijabetesom etil piruvatom

Imunoblot analiza homogenata jetre pacova na prisustvo ukupnih Bax i Bcl-2 proteina pokazala je da tokom tretmana pacova sa dijabetesom dolazi do smanjenja prisustva pro-apoptotskog Bax proteina za 40% ($p < 0,05$) i uvećanja prisustva anti-apoptotskog Bcl-2 proteina za 25% ($p < 0,05$). Ovakva promena njihovog prisustva se odražava i na njihov odnos koji je smanjen za oko 53%, $p < 0,05$ (**Slika 44B.**) Ovaj rezultat govori u prilog smanjenju aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze i apoptoze uopšte.



Slika 44. Imunoblot analiza proteina ukupnih homogenata jetre pacova na prisustvo Bax, Bcl-2, Akt i p-Akt (A) Graficki prikaz odnosa Bax/Bcl-2 (B) i p-Akt/Akt (C). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Smanjenje aktivacije JNK signalnog puta izazvanog smanjenjem prisustva vanćelijskog HMGB1 proteina i njegovih interakcija sa TLR4, ima za posledicu održanje aktivnosti Akt kinaze koja je važna komponenta signalnih puteva uključenih u preživljavanje ćelija. Iako nema promena u ukupnoj prisutnosti Akt kinaze, njena aktivnost je na kontrolnom nivou kod pacova sa dijabetesom tretiranih etil piruvatom

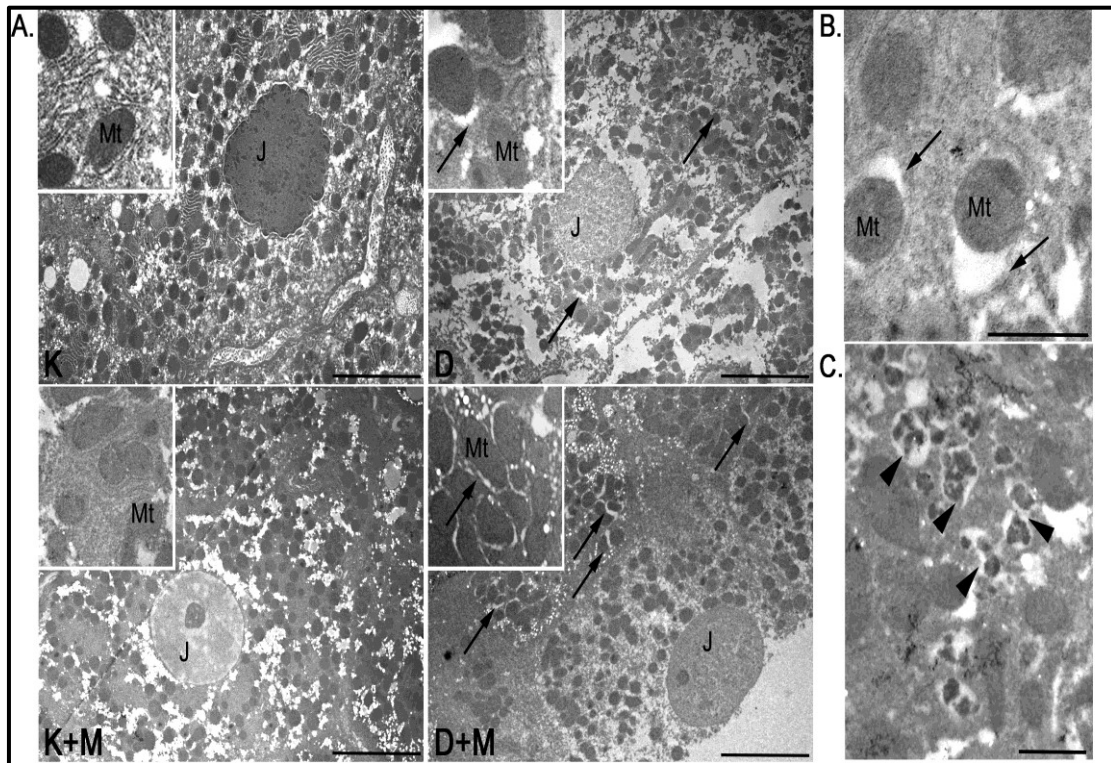
što se vidi kroz odnos p-Akt/Akt kinaze (**Slika 44A.**). Ovaj rezultat ukazuje da srazmerno svojoj prisutnosti i nivou interakcija sa TLR4, HMGB1 učestvuje u određivanju odnosa aktivacije puteva koji vode ćelijskoj smrti i puteva koji vode preživljavanju. Prikazani rezultati upućuju na zaključak da permanentno uvećanje prisustva HMGB1 proteina u vanćelijskoj sredini doprinosi uvećanoj prisutnosti apoptoze u jetri pacova sa dijabetesom.

4.4. Prisutnost autofagije u ćelijama jetre dijabetičnih pacova i uloga HMGB1 proteina

4.4.1. Prisustvo autofagije u jetri dijabetičnih pacova

4.4.1.1. Analiza prisustva autofagije transmisionom elektronskom mikroskopijom

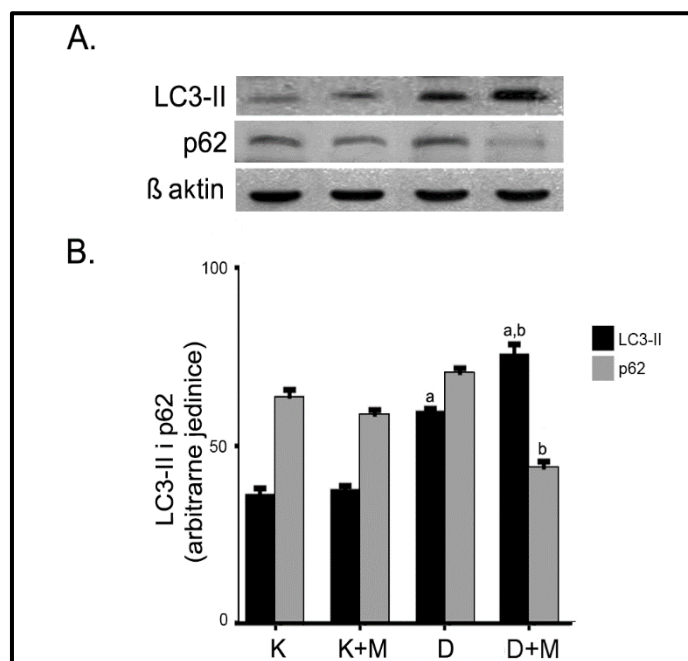
Autofagija, ima citoprotektivnu ulogu ali može dovesti do smrti ćelije u slučaju neadekvatne ili povišene aktivacije. Iako uloga autofagije u dijabetesu nije još sasvim jasna, ima podataka koji govore u prilog tome da disfunkcionalna autofagija praćena prisustvom nefunkcionalnih mitohondrija može biti bitan faktor u razvoju i prevenciji dijabetesa (Jung i sar., 2010). Prisustvo autofagije u jetri pacova sa dijabetesom ispitivano je najpre korišćenjem transmisione elektronske mikroskopije koja je detektovala prisustvo unutarćelijskih oštećenja, pre svega mitohondrija, i prisustvo autofagozoma, glavne morfološke karakteristike aktiviranog procesa autofagije (**Slika 45A.**). Subćelijska oštećenja se vidno smanjuju sa snižavanjem stepena oksidativnog stresa postignutim tretmanom dijabetičnih pacova sa melatoninom (**Slika 45A.**). Struktura mitohondrija je uglavnom očuvana, a poboljšanje u strukturi jetre praćeno je i uvećanim prisustvom formiranih autofagozoma (**Slika 45B.**) i autofagolizozoma (**Slika 45C.**).



Slika 45. Autofagija u jetri dijabetičnih pacova (A) Reprezentativni elektronske mikrografije preseka jetre izabrane iz sve četiri eksperimentalne grupe: K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. U jetri dijabetičnih pacova uočava se značajno oštećenje hepatocita, naročito mitohondrija. Isečci u gornjem levom uglu ukazuju na mitohondrijalne promene. Tretman melatoninom karakteriše manji broj oštećenih mitohondrija i veće prisustvo autofagije videne kroz veće prisustvo autofagozoma; (B) ↗, autofagozomi u D+M; (C) ▶, autofagolizozomi u D+M A; razmer: 5µm; uveličanje isečka x15000. B i C; razmer: 1 µm. Mt – mitohondrije; J – jedro.

4.4.1.2. Analiza prisustva autofagije preko LC3-II markera autofagije i degradacije p62

U aktivaciji i regulaciji procesa autofagije učestvuju proizvodi Atg gena, među kojima su najbitniji i najčešće korišćeni kao markeri ovog procesa Atg6 ili Beklin1 i Atg8 ili LC3. Beklin1 je neophodan za formiranje autofagozoma, dok LC3 učestvuje u sazrevanju autofagozoma, pri čemu prelazi iz solubilne citoplazmatske forme-LC3-I u LC3-II formu koja se ugrađuje u membranu autofagozoma (Mizushima, 2007). Za dalju analizu prisustva autofagije u dijabetesu i promena koje nastaju u uslovima tretmana melatoninom, analizirano je prisustvo LC3-II proteina u citoplazmatskoj frakciji ćelija jetre pacova.



Slika 46. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo LC3-II i p62 (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

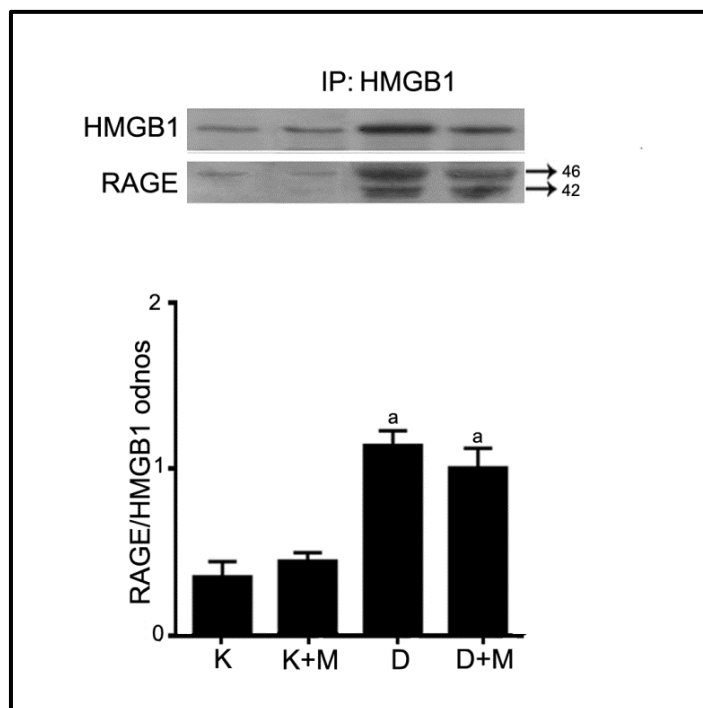
Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre detektovala je 3,2 puta ($p < 0,05$) veće prisustvo LC3-II forme u jetri pacova sa dijabetesom u poređenju sa kontrolnim vrednostima (**Slika 46B.**). Prisustvo LC3-II forme je dodatno uvećano u citoplazmi ćelija jetre dijabetičnih pacova koji su tretirani melatoninom gde je prisustvo LC3-II forme 4,8 puta ($p < 0,05$) veće u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

Aktivnost procesa autofagije praćena je i kroz stepen degradacije p62 proteina koji predstavlja signalni protein uključen u transport proteina obeleženih za degradaciju u proteazomima i jedan je od prvih proteina koji se degraduju u autofagolizozomima kada se proces autofagije odigrava pravilno. Imunoblot analiza prisustva p62 (**Slika 46A.**) je pokazala neznačajno povećanje nivoa ovog proteina u citoplazmatskoj frakciji ćelija jetre dijabetičnih pacova (**Slika 46B.**). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom doveo je do smanjenja prisustva p62 za 42% ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima u dijabetičnoj grupi. Veće prisustvo autofagozoma, aktivne degradacije p62 i akumulacije LC3-II forme jasno govore u prilog zaključku da tretman sa melatoninom intenzivira aktivaciju autofagije. Sa druge strane, neznačajna promena degradacije p62 ukazuje na moguće prisustvo nedovoljne ili defektne autofagije u dijabetesu.

4.4.2. Učešće HMGB1 proteina u aktivaciji autofagije u jetri pacova sa dijabetesom

4.4.2.1. Interakcije HMGB1 proteina sa RAGE receptorom

Vanćelijski prisutan HMGB1 protein može učestvovati u pokretanju procesa autofagije u ćeliji preko svojih interakcija sa RAGE receptorom i njime aktiviranim signalnim putevima ERK kinaze. Shodno ovome, najpre su analizirane interakcije HMGB1 proteina sa RAGE receptorom u ispitivanim eksperimentalnim uslovima. Imunoprecipitovan HMGB1 protein iz jednakih količina ukupnih homogenata jetre pacova podvrgnut je analizi na prisustvo RAGE receptora korišćenjem metode imunoblota. Kao što se može videti (**Slika 47.**), interakcije između HMGB1 i RAGE receptora su 2,6 puta ($p < 0,05$) više zastupljene u jetri pacova sa dijabetesom nego u jetri kontrolnih pacova i pacova tretiranih samo melatoninom. Tretman dijabetičnih pacova melatoninom nije doveo do značajnog smanjenja interakcija.

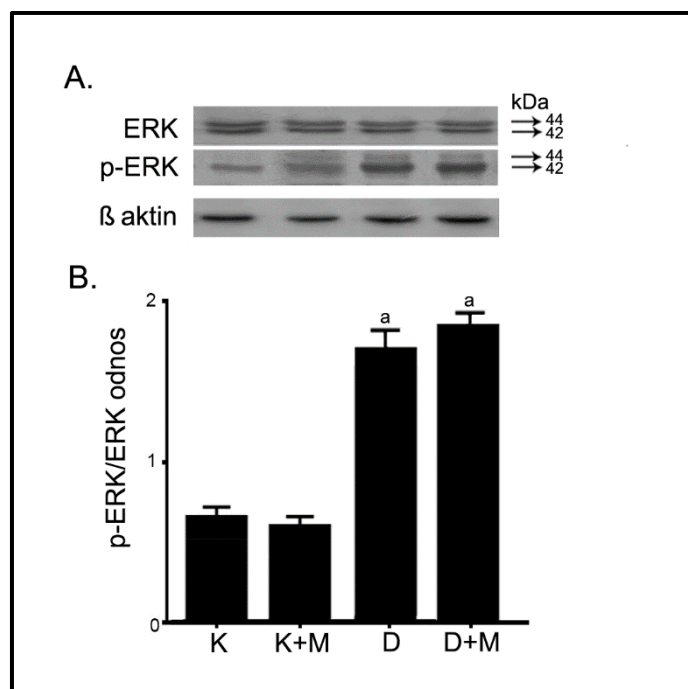


Slika 47. Interakcije HMGB1 proteina sa RAGE receptorom. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-HMGB1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-RAGE antitela. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.4.2.2. Promene u aktivnosti ERK kinaze posredovane HMGB1/RAGE interakcijama

U fiziološkim uslovima, aktivnost citoplazmatskog Beklin1 proteina, jednog od glavnih faktora inicijacije autofagije, je inhibirana interakcijom sa Bcl-2 proteinom. Fosforilacija Beklin1 ili Bcl-2 proteina, dovodi do njihove disocijacije i oslobađanja Beklin1 proteina čime on postaje dostupan za interakcije sa drugim proteinima, učesnicima u formiranju autofagozoma. Do fosforilacije Bcl-2 proteina u citoplazmi dolazi posredstvom aktivirane ERK kinaze. Kako se ERK kinaza aktivira fosforilacijom na tirozinu, nakon vezivanja za aktivirani RAGE receptor, sa ciljem da se ispita aktivnost ERK kinaze u jetri pacova sa dijabetesom i dobijene promene povežu sa vezivanjem HMGB1 proteina za RAGE receptor, rađena je imunoblot analiza na prisustvo ukupne i fosforilisane odnosno aktivne forme ERK kinaze. Poliklonskim antitelom na ERK i p-ERK, ovaj protein je detektovan u svim analiziranim uzorcima u

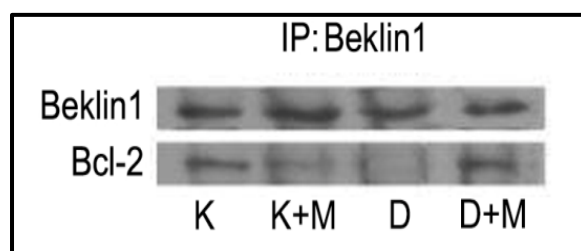
vidu izoformi od 42 kDa i 44 kDa (**Slika 48A.**). Poređenjem prisustva ERK izoformi u citoplazmatskoj frakciji ćelija jetre izolovanih iz kontrolnih i dijabetičnih pacova kao i jetri kontrolnih i dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom, razlike nisu uočene. Međutim, detektovan je porast aktivnosti ERK u jetri pacova sa dijabetesom, s obzirom da je fosforilacija ERK izoforme od 44 kDa uvećana 2,8 puta ($p < 0,05$) a izoforme od 42 kDa 20 puta ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim vrednostima, što je dovelo do porasta odnosa p-ERK/ERK (**Slika 48B.**). Tretman dijabetičnih pacova melatoninom nije uticao na uvećanu aktivnost ERK kinaze što koreliše sa skoro nepromenjenim nivoom HMGB1 interakcija sa RAGE receptorom.



Slika 48. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo ERK i p-ERK (A) sa grafičkim prikazom pERK/ERK odnosa (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.4.2.3. Uticaj aktivacije ERK-a na protein-protein interakcije Beklin1 i Bcl-2 proteina u jetri pacova sa dijabetesom

Kako bi se ispitalo da li aktivacija ERK kinaze u uslovima dijabetesa dovodi do promene u nivou interakcije između Beklin1 i njegovog inhibitora, Bcl-2 proteina, urađena je imunoprecipitacija Beklin1 proteina iz citoplazmatske frakcije ćelija jetri kontrolnih, dijabetičnih, i kontrolnih i dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom. Nakon toga su imunoblotom analizirane protein-protein interakcije između Beklin1 proteina i Bcl-2, korišćenjem antitela naspram Bcl-2. Dobijeni rezultati su pokazali da dolazi do smanjenja interakcija između ova dva proteina u citoplazmi jetre dijabetičnih pacova (Slika 49.). U citoplazmatskoj frakciji ćelija jetri dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom interakcija između Beklin1 i Bcl-2 proteina kao da nema.

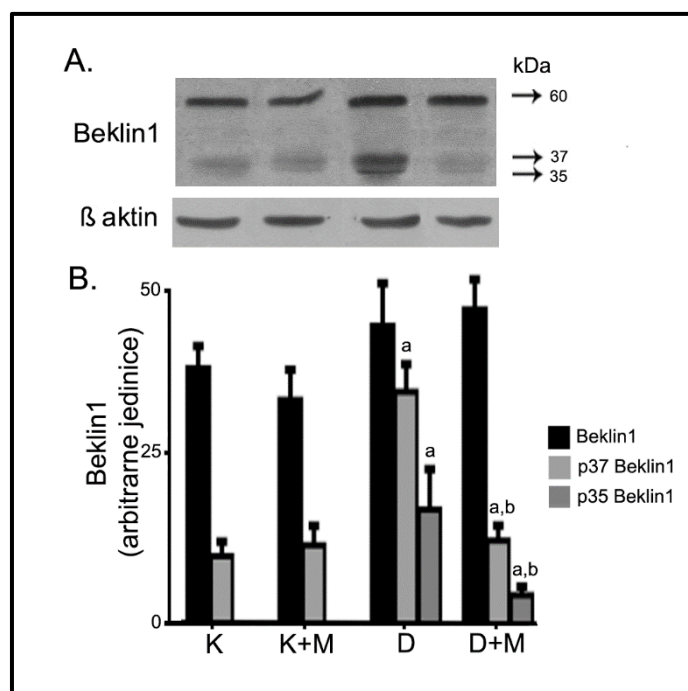


Slika 49. Interakcije Beklin1 proteina sa Bcl-2 u citoplazmi ćelija jetre. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-Beklin1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblot na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-Bcl-2 antitela. K – kontrolna grupa, K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom.

4.4.2.4. Analiza interakcija između Beklin1 i HMGB1 proteina u jetri pacova sa dijabetesom

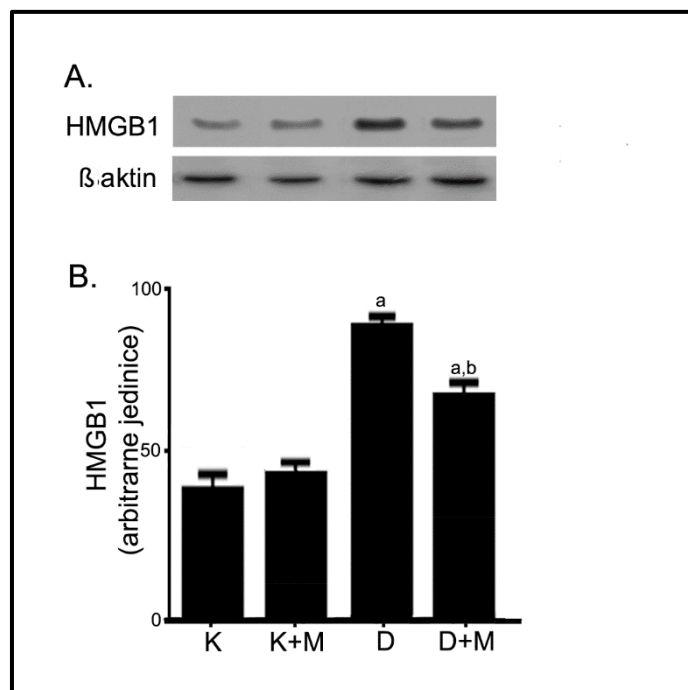
HMGB1 u citoplazmi ćelija ima značajnu ulogu u inicijaciji procesa autofagije, odnosno u regulaciji formiranja autofagozoma. Ulogu u ovom procesu HMGB1 ostvaruje kroz direktnu interakciju sa Beklin1 proteinom, kompeticijom za mesto vezivanja Bcl-2 proteina. Imunoblot analizom citoplazmatskih frakcija ćelija jetre kontrolnih, dijabetičnih, kao i kontrolnih i dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom, detektovan je Beklin1 protein na poziciji molekulske mase 60 kDa, ali i dve dodatne proteinske trake na poziciji molekulske mase od 35 kDa i 37 kDa koje su značajno

prisutne (p35 kDa je uvećana 5,7 puta, a p35 2,8 puta u poređenju sa kontrolom, $p < 0,05$) kod dijabetičnih pacova (**Slika 50A.**). Nivo p60 Beklin1 proteina je blago povišen u dijabetičnim grupama ali neznačajno. Fragmenti od 35 i 37 kDa su kod dijabetičnih životinja tretiranih melatoninom svedeni na kontrolni nivo (**Slika 50B.**).



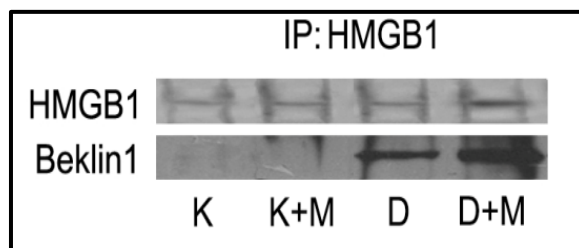
Slika 50. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo Beklin1 proteina (A) sa grafičkim prikazom rezultata kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Imunoblot analizom prisustva HMGB1 proteina u citoplazmatskoj frakciji ćelija jetre detektovano je 2,5 puta ($p < 0,05$) veće prisustvo HMGB1 proteina u citoplazmi jetre dijabetičnih pacova u poređenju sa kontrolnim uzorcima (**Slika 51B.**). U uslovima tretmana dijabetičnih pacova melatoninom prisustvo HMGB1 proteina je smanjeno za 21% ($p < 0,05$), ali je i dalje značajno veće (oko 2 puta) kada se uporedi sa kontrolnim vrednostima.



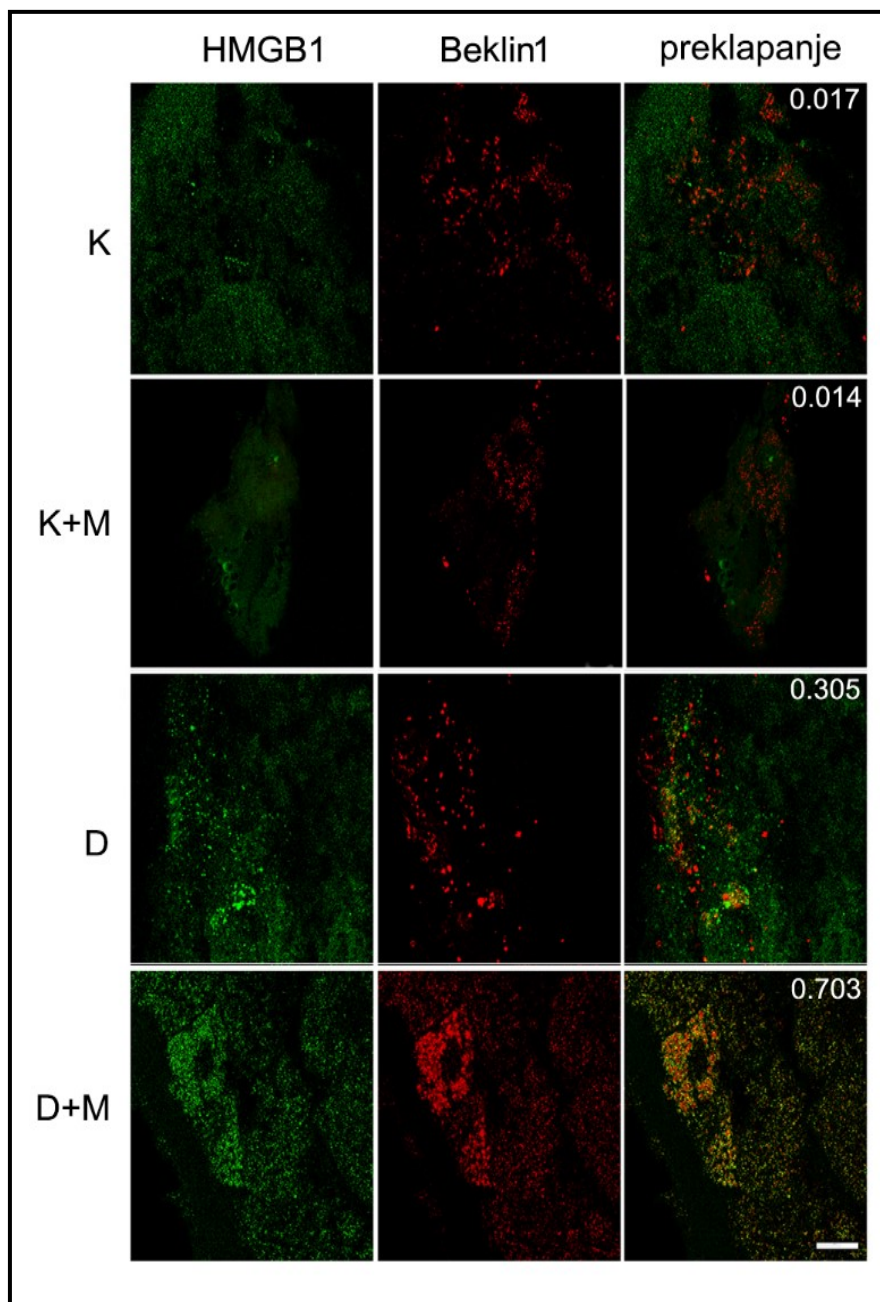
Slika 51. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcija ćelija jetre pacova na prisustvo HMGB1 proteina (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Interakcije između HMGB1 i Beklin1 proteina u citoplazmi ćelija jetre ispitivanih eksperimentalnih grupa analizirane su metodama imunoprecipitacije i kolokalizacije. Za analizu protein-protein interakcija, HMGB1 je imunoprecipitovan iz citoplazmatskih frakcija a potom analiziran na prisustvo Beklin1 metodom imunoblota korišćenjem anti-Beklin1 antitela. Rezultati (**Slika 52.**) pokazuju skoro potpuno odsustvo interakcija između HMGB1 i Beklin1 proteina u citoplazmi ćelija jetre kontrolnih pacova i kontrolnih pacova tretiranih melatoninom dok je u uzorcima dijabetičnih pacova detektovano prisustvo ovih interakcija. Tretman dijabetičnih pacova melatoninom povećava nivo ovih interakcija.



Slika 52. Interakcije HMGB1 sa Beklin1 proteinom u citoplazmi ćelija jetre pacova. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-HMGB1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-Beklin1 antitela. K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom.

U prilog postojanja detektovanih interakcija između HMGB1 i Beklin1 proteina idu rezultati analize verovatnoće preklapanja prisustva ispitivanih proteina na istom mestu u ćeliji, dobijeni metodom kolokalizacije (**Slika 53.**). Vrednosti Pirsonovog koeficijenta ukazuju na visok stepen kolokalizacije između HMGB1 i Beklin1 proteina u jetri dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom ($0,703 \pm 0,021$) i slab stepen kolokalizacije u jetri dijabetičnih pacova ($0,305 \pm 0,062$) s obzirom da je njegova vrednost ispod 0,5. Kod kontrolnih životinja kao i kod onih tretiranih samo melatoninom preklapanje je nasumično.

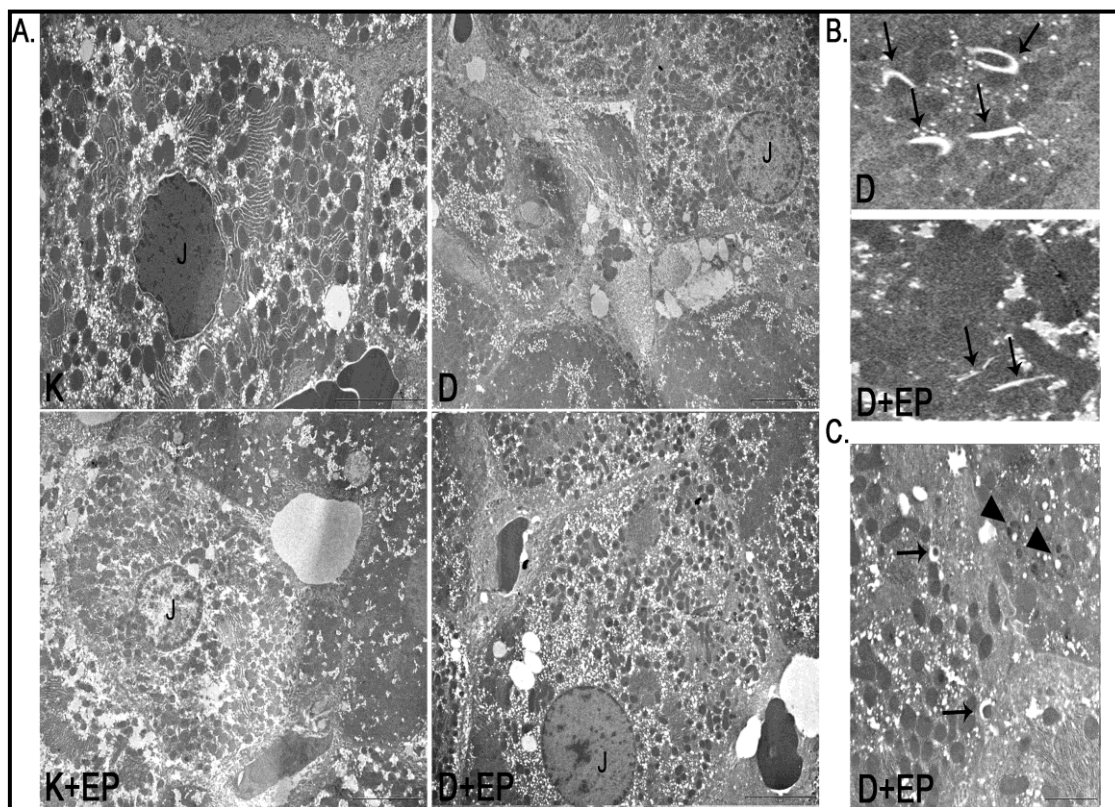


Slika 53. Kolokalizacija HMGB1 i Beklin1 proteina u jetri pacova. HMGB1 je obeležen zelenom fluorescentnom bojom, a Beklin1 protein crvenom. Kolokalizacija ova dva proteina fluorescira žuto a nastala je kao rezultat preklapanja pojedinačnih slika sa obeleženim HMGB1 i Beklin1 proteinom. Kvantifikacija stepena preklapanja između ova dva proteina je izražena kao Pirsonov koeficijent korelacije r . Minimalna r vrednost za značajan stepen kolokalizacije iznosi 0,5. K+M – kontrolna grupa tretirana melatoninom, D – dijabetična grupa, D+M – dijabetična grupa tretirana melatoninom.

4.4.3. Inhibicija sekrecije HMGB1 proteina etil piruvatom i promene u aktivaciji autofagije u jetri pacova sa dijabetesom

4.4.3.1. Analiza prisustva autofagije transmisionom elektronskom mikroskopijom

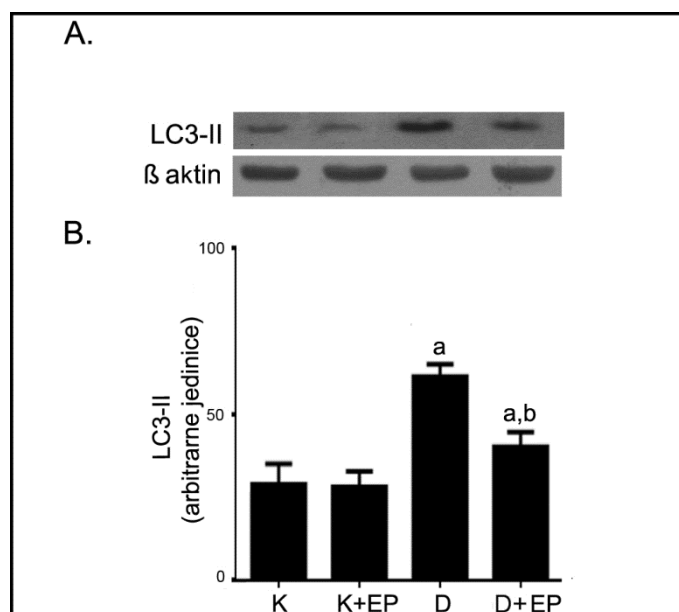
Transmisionom elektronskom mikroskopijom pokazano je da u toku tretmana dijabetičnih pacova etil piruvatom dolazi do značajnog smanjenja subćelijskih oštećenja i prisustva autofagozoma u jetri (Slika 54A., B.). Analiza elektronskih mikrografa navodi na zaključak da etil piruvat verovatno pospešuje poslednji korak mitofagije-degradaciju oštećenih mitohondrija u lizosomalnom sistemu što dovodi do ublažavanja posledica dijabetesa (Slika 54C.).



Slika 54. Reprezentativni elektronski mikrografi preseka jetre izabrani iz sve četiri eksperimentalne grupe (A): K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Tretman dijabetičnih pacova etil piruvatom doveo je do značajnog smanjenja subćelijskih oštećenja; (B.) autofagni profili kod dijabetičnih životinja sa i bez tretmana etil piruvatom ↗, autofagozomi; (C.) ↗, autofagozomi; ►, autofagolizozomi u D+EP A; razmer: 5 µm; B. i C; razmer 1 µm. J-jedro.

4.4.3.2. Analiza prisustva autofagije preko LC3-II markera autofagije

Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova sa dijabetesom koji su tretirani etil piruvatom detektovala je smanjenje prisustva LC3-II forme za 35% ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima kod dijabetične grupe (Slika 55B.).

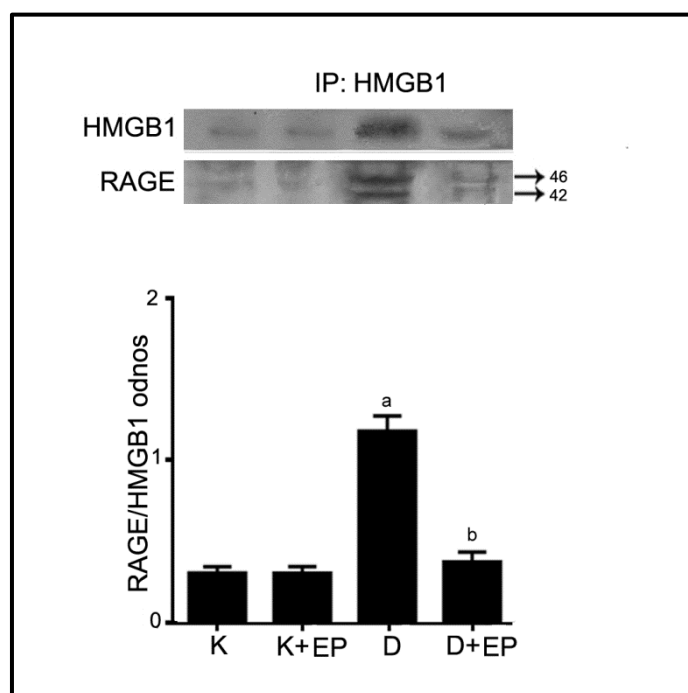


Slika 55. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo LC3-II (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. . K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Rezultati dobijeni elektronskom mikroskopijom kao i analizom prisustva LC3-II forme ukazuju da kod pacova sa dijabetesom tretman etil piruvatom dovodi do smanjenja nivoa autofagije u jetri.

4.4.3.3. Uticaj etil piruvata na interakcije između HMGB1 i RAGE u jetri pacova sa dijabetesom

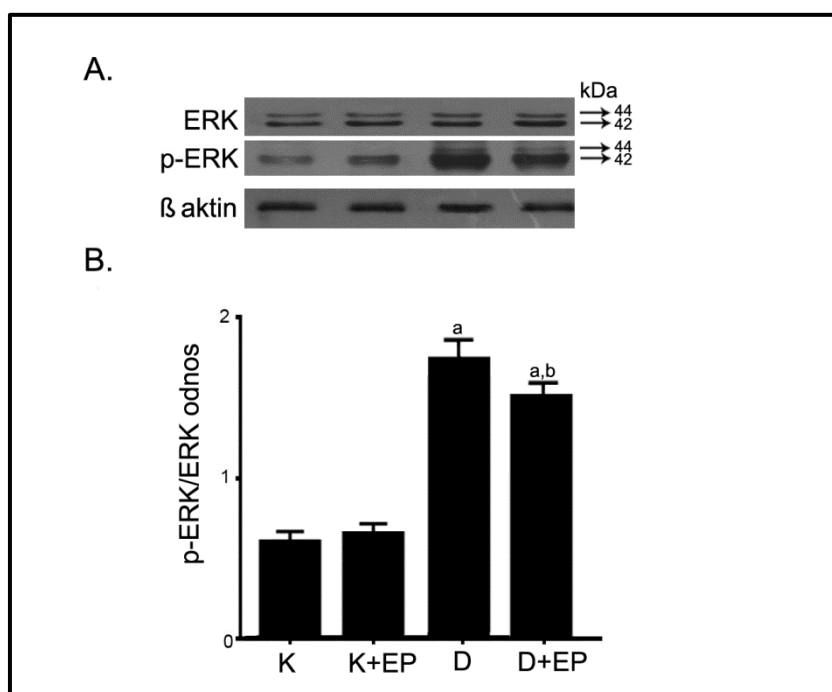
Koimunoprecipitaciona analiza interakcija između HMGB1 proteina i RAGE receptora pokazala je da tretman kontrolnih pacova etil piruvatom ne dovodi do promena u nivou njihovih interakcija, dok je kod dijabetičnih pacova detektovala smanjenje nivoa njihovih interakcije za 75%, $p < 0,05$ (Slika 56.). Ovo smanjenje može biti posledica smanjenja ukupnog nivoa HMGB1 detektovanog u serumu (Slika 37A.)



Slika 56. Interakcije HMGB1 proteina sa RAGE receptorom. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-HMGB1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-RAGE antitela. . K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.4.3.4. Uticaj etil piruvata na HMGB1/RAGE posredovanu aktivaciju ERK signalnog puta

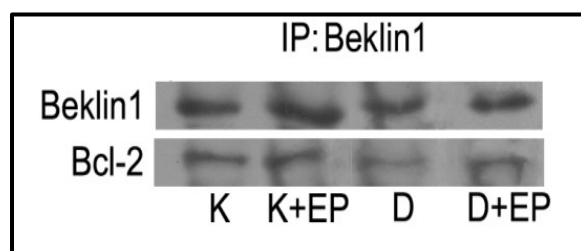
Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre na prisutnost i aktivnost ERK kinaze pokazala je da tretman etil piruvatom ne dovodi do promena u prisutnosti ukupne ERK kinaze ni kod kontrolnih ni kod dijabetičnih pacova (**Slika 57.**), ali dovodi do smanjenja uvećane aktivnosti ERK izoformi u jetri pacova sa dijabetesom (p-p44 za 35%, a p42 za 20% ; $p < 0,05$) što rezultuje smanjenjem odnosa p-ERK/ERK u citoplazmi ćelija jetre dijabetičnih pacova tretiranih etil piruvatom.



Slika 57. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo ERK i p-ERK (A) sa grafičkim prikazom odnosa p-ERK/ERK (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

4.4.3.5. Analiza interakcija između Beklin1 i Bcl-2 proteina u jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana etil piruvatom

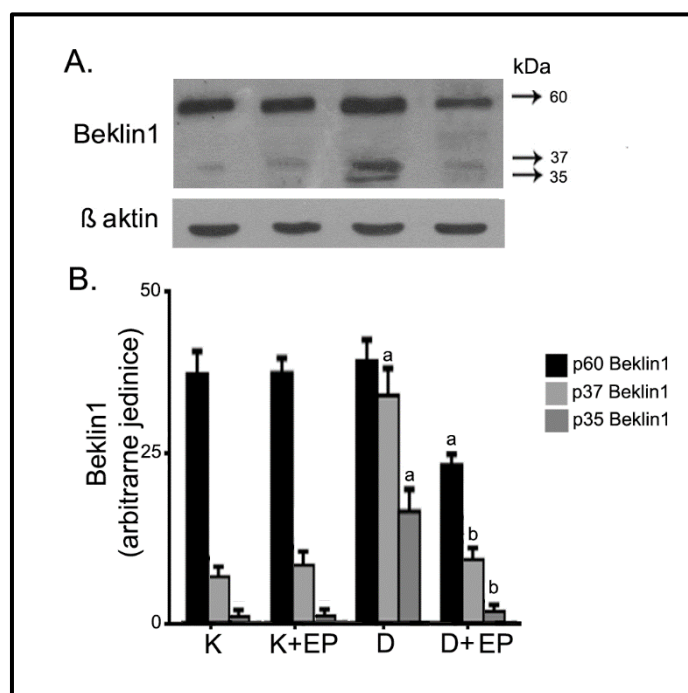
Koimunoprecipitaciona analiza interakcija između Beklin1 proteina i Bcl-2 u citoplazmi ćelija jetre, pokazala je da tretman kontrolnih pacova etil piruvatom ne dovodi do promena u nivou njihovih interakcija. U citoplazmi jetre pacova sa dijabetesom koji su tretirani etil piruvatom, detektovan je izvestan porast interakcija između Beklin1 i Bcl-2 proteina u poređenju sa dijabetičnom grupom kod kojih je nivo njihovih interakcija niži u odnosu na kontrolne pacove (Slika 58.).



Slika 58. Interakcije Beklin1 proteina sa Bcl-2 u citoplazmi ćelija jetre. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-Beklin1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-Bcl-2 antitela. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom.

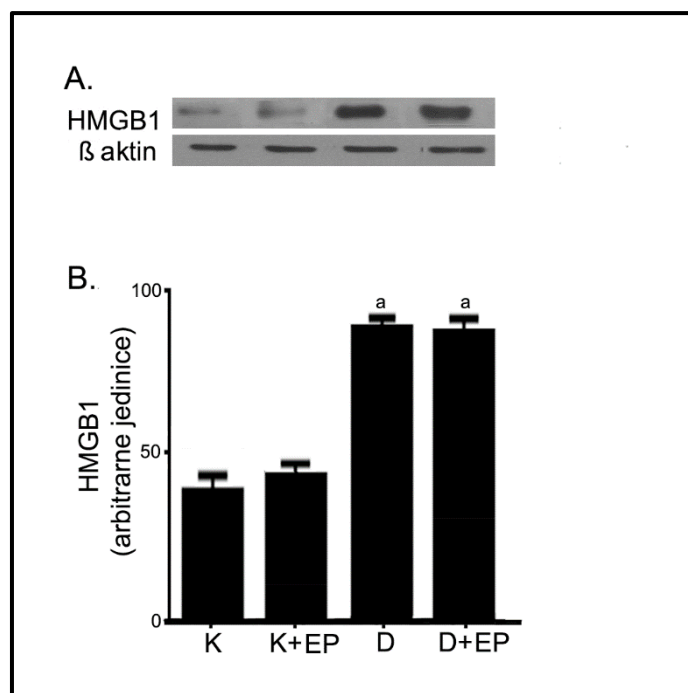
4.4.3.6. Analiza interakcija između Beklin1 i HMGB1 proteina u jetri pacova sa dijabetesom nakon tretmana etil piruvatom

Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pokazala je da tretman etil piruvatom ne dovodi do promene u nivou Beklin1 proteina kod kontrolnih pacova, dok kod dijabetičnih pacova smanjuje prisustvo p60 Beklin1 proteina za oko 50% ($p < 0,05$), kao i prisustvo p35 i p37 izoformi do kontrolnog nivoa (Slika 59B.).



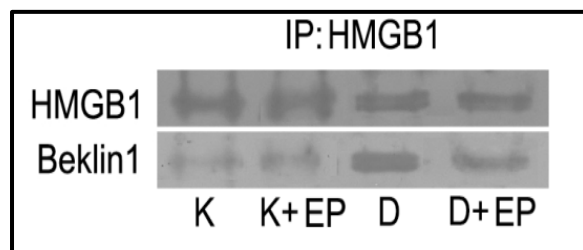
Slika 59. Imunoblot analiza proteina citoplazme ćelija jetre pacova na prisustvo Beklina1 (A), sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo HMGB1 proteina pokazala je da tretman etil piruvatom ne dovodi do promena u nivou detektovanog HMGB1 proteina ni kod kontrolnih ni kod dijabetičnih pacova. Prisutnost HMGB1 proteina je i dalje oko 2,5 puta veća ($p < 0,05$) kod dijabetičnih grupa u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (**Slika 60B.**).



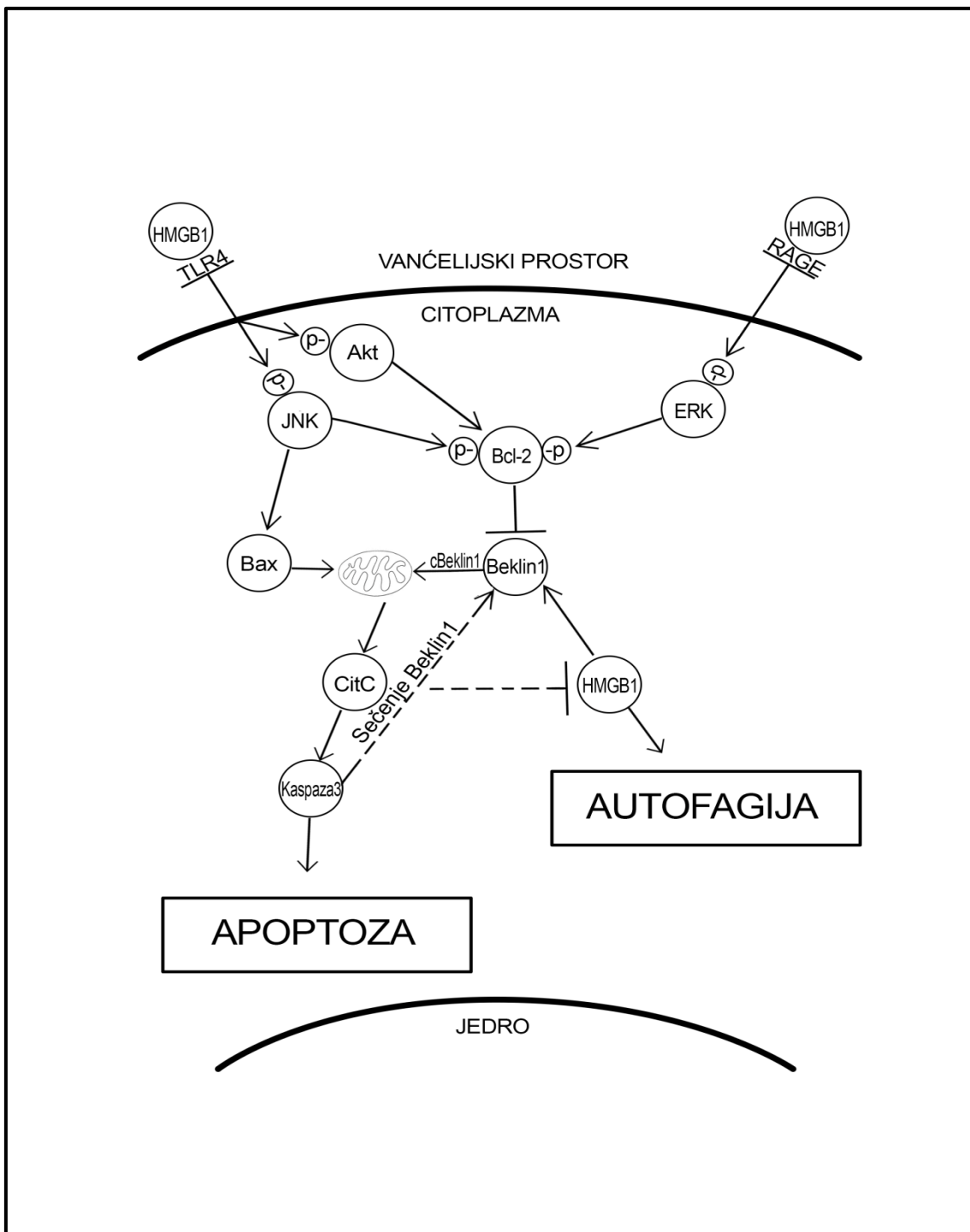
Slika 60. Imunoblot analiza citoplazmatske frakcije ćelija jetre pacova na prisustvo HMGB1 proteina (A) sa grafičkim prikazom kvantifikacije dobijenih promena (B). Prikazani rezultati kvantifikacije predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. . K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom;.

Analiza interakcija između HMGB1 i Beklin1 proteina pokazala je da tretman etil piruvatom nije značajno uticao na nivo njihovih interakcija u jetri kontrolnih pacova, ali je smanjio stepen njihovih interakcije u citoplazmi ćelija jetre dijabetičnih pacova (**Slika 61.**). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa uočenim smanjenjem prisustva Beklin1 proteina kod ove eksperimentalne grupe, kao i smanjenjem disocijacije Bcl-2 proteina sa Beklin1.



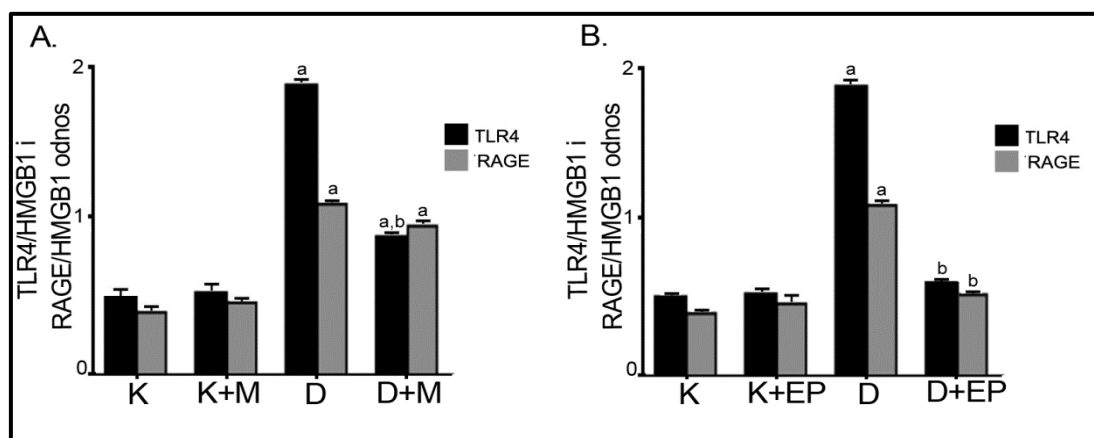
Slika 61. Interakcije između HMGB1 i Beklin1 proteina u citoplazmi ćelija jetre pacova. Nakon imunoprecipitacije HMGB1 proteina iz ukupnih homogenata jetri pacova korišćenjem anti-HMGB1 antitela, dobijeni precipitati su elektroforetski razdvojeni, preneti na PVDF membranu i analizirani metodom imunoblota na prisustvo protein-protein interakcija korišćenjem anti-Beklin1 antitela. . K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom.

Prikazani rezultati govore u prilog učešća HMGB1 proteina u realizaciji procesa autofagije preko aktivacije signalnih puteva pokrenutih sa RAGE receptora i preko učestvovanja u formiranju autofagozoma. Takođe, rezultati ukazuju da od nivoa prisustva HMGB1 proteina u vanćelijskoj sredini zavisi intenzitet autofagije. U prilog ovom zaključku govore oprečni rezultati tretmana dobijeni sa dijabetičnim grupama tretiranim melatoninom ili etil piruvatom. Tretman melatoninom je doveo do manjeg smanjenja vanćelijske prisutnosti HMGB1 proteina u poređenju sa tretmanom etil piruvatom, što je bilo praćeno uvećanjem prisustva autofagije u jetri pacova sa dijabetesom. Dobijene razlike pratila je različita aktivacija ERK kinaze, ali i JNK i Akt kinaza koje su kontrolisane aktivacijom sa TLR4 receptora. Ovaj podatak ukazuje na postojanje zajedničkih učesnika signalizacije autofagije i apoptoze. Na osnovu prikazane **Slike 62** ključni korak u određivanju intenziteta autofagije je disocijacija Bcl-2 sa Beklin1 proteina.



Slika 62. Potencijalni model zajedničke regulacije puteva apoptoze i autofagije od strane HMGB1 proteina u ćelijama jetre tokom dijabetesa. p – fosfo grupa; CitC – citohrom C; cBeklin1 – apoptotski fragmenti Beklin1 proteina.

Kod dijabetičnih pacova i ako dolazi do disocijacije Bcl-2 proteina sa Beklin1 aktivirana kaspaza 3 seče Beklin1 na apoptotske fragmente čime se gubi sposobnost ovog proteina da aktivira formiranje autofagozoma kroz interakciju sa citoplazmatskim HMGB1. Kod tretmana i melatoninom i etil piruvatom utišana je aktivnost kaspaze 3 i kod tretmana melatoninom disocijacija Bcl-2 je skoro potpuna dok je ona mnogo manje izražena kod tretmana sa etil piruvatom,. To ima za posledicu manje prisustvo autofagozoma u jetri pacova sa dijabetesom tretiranim etil piruvatom. Disocijacija Bcl-2 sa Beklin1 je najverovatnije posledica njegove fosforilisanosti posredovane ERK kinazom ali i JNK čiju aktivnost reguliše vanćelijski HMGB1 preko interakcija sa TLR4 i RAGE. Ovaj podatak upućuje na zaključak da, možda, ravnotežu kapaciteta aktivacije između ovih kinaza određuje stepen fosforilisanosti Bcl-2 i njegovih interakcija sa Beklin1 (**Slika 62.**). Ovo pak upućuje na to da ravnotežu između stepena aktivacije TLR4 i RAGE receptora određuju aktivacije ERK, JNK i Akt kinaza. Poređenjem interakcija između HMGB1 i TLR4 sa interakcijama između HMGB1 i RAGE uočava se veće vezivanje HMGB1 sa RAGE receptorima u toku tretmana dijabetičnih pacova sa melatoninom. Tretman sa etil piruvatom dodatno umanjuje stepen interakcije HMGB1 proteina sa TLR4, a sa druge strane značajno smanjuje vezivanje za RAGE u poređenju sa dijabetičnim pacovima tretiranih melatoninom (**Slika 63.**).



Slika 63. Uticaj melatonina (A) i etil piruvata (B) na nivo interakcija HMGB1 proteina sa TLR4 i RAGE receptorima u jetri dijabetičnih pacova. K – kontrolna grupa, K+EP – kontrolna grupa tretirana etil piruvatom, D – dijabetična grupa, D+EP – dijabetična grupa tretirana etil piruvatom. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška; a, $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; b, $p < 0,05$ u poređenju sa dijabetičnom grupom.

5. DISKUSIJA

Osnovni zadatak ovog istraživanja bio je utvrđivanje uloge HMGB1 u modifikaciji i integraciji puteva apoptoze i autofagije u jetri dijabetičnih pacova. Poznato je da je vanćelijski HMGB1 marker nekroze i da je ovaj protein preko TLR4 i RAGE receptora može da reguliše aktivaciju apoptoze i autofagije u ćeliji (Thang i sar., 2010a). Kako dijabetes karakteriše stanje hronične hiperglikemije koja dovodi do pojave hroničnog oksidativnog stresa u jetri, a oksidativni stres može izazvati različite tipove ćelijske smrti usled promena izazvanih u ćelijskom metabolizmu (Brownlee, 2001), ispitana je moguća uloga HMGB1 u određivanju profila ćelijske smrti kroz njegove uloge u modulaciji signalnih puteva apoptoze i autofagije u jetri pacova sa dijabetesom.

Nakon izlaganja štetnom delovanju oksidativnog stresa izazvanog prisustvom hiperglikemije, neimune i imune ćelije jetre aktiviraju adaptivne odgovore, uključujući autofagiju, kako bi povratile ravnotežno stanje. Ukoliko takav odgovor postane nedovoljan, stresirane ćelije podležu apoptozi ili nekrozi tokom koje dolazi do oslobađanja HMGB1 i drugih DAMP proteina u vanćelijsko okruženje. Vezujući se za specifične receptore prisutne na površini neimunskih i imunskih ćelija jetre, ovi proteini mogu pokrenuti kaskadu molekularnih događaja putem koji, povezujući inflamaciju i ćelijsku smrt, mogu uticati na intenzitet tkivnog oštećenja (Brenner i sar., 2013).

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je nivo vanćelijskog HMGB1 proteina u serumu i jetri pacova sa dijabetesom u korelaciji sa nivoom oštećenja jetre i prisutne nekroze. Ovaj podatak je potvrdio njegovu ulogu kao nekrotskog markera i pretpostavku da kao takav može biti iskorišćen za praćenje patoloških pojava i razvoja dijabetičnih komplikacija. Dalji rezultati su pokazali dvostruko delovanje HMGB1 proteina na odnos prisutne apoptoze i autofagije. Dvostruko delovanje se manifestuje kroz i) uticaj vanćelijski prisutnog HMGB1 proteina na aktivaciju procesa apoptoze i autofagije preko vezivanja za receptore TLR4 i RAGE na površini ćelija jetre i aktivaciju nizvodnih signalnih puteva i ii) uticaj HMGB1 proteina iz citoplazme, u kojoj kroz interakcije sa dostupnim Beklin1 proteinom učestvuje u formiranju autofagozoma i realizaciji autofagije. Pokazano je i da nivo vanćelijske prisutnosti HMGB1 proteina i

njegov doprinos profilu ćelijske smrti u jetri, izraženom kroz odnos apoptoze i autofagije, zavisi od intenziteta prisutnog oksidativnog stresa. Na ovaj način je dat još jedan doprinos karakterizaciji HMGB1 kao proteina osetljivog na redoks stanje. S tim u vezi pokazano je da u uslovima oksidativnog stresa prisutnog u nelečenom dijabetesu, HMGB1 protein favorizuje puteve apoptoze i doprinosi ćelijskoj smrti i oštećenju jetre, dok u uslovima blago prisutnog oksidativnog stresa, njegovo delovanje je citoprotektivno jer favorizuje aktivaciju autofagije i uklanjanje oštećenih unutarćelijskih struktura.

Na postojanje oštećenja i patoloških promena u jetri pacova sa dijabetesom ukazali su nalazi poput smanjenja apsolutne i relativne mase jetre, uvećano prisustvo transaminaza ALT i AST u serumu, uvećano prisustvo O^{2-} , H_2O_2 i stepena lipidne peroksidacije u serumu i jetri, kao i pad aktivnosti antioksidativnih enzima. Komet esejem detektovano je i značajno prisustvo DNK oštećenja u ćelijama jetre, dok su histopatološke analize ustanovile promene u strukturi jetre i značajno prisustvo nekrotskih ćelija. Snižavanjem stepena oksidativnog stresa tretmanom melatoninom, koji nije značajno uticao na nivo insulina i glukoze, došlo je do značajnog smanjenja DNK oštećenja i stepena nekroze u jetri dijabetičnih pacova. Istovremeno je uočeno na histološkim preparatima da je došlo do normalizacije morfološke strukture jetre, što je bilo praćeno i manjim nivoom ALT i AST u serumu i normalizacijom apsolutne i relativne mase jetre. Sve ove promene nedvosmisleno govore u prilog tome da oksidativni stres u jetri dijabetičnih pacova značajno doprinosi poremećaju njene funkcionalnosti, što je u saglasnosti i sa brojnim literaturnim podacima (Loria i sar., 2013). Osim toga, prisustvo nekroze govori u prilog postojanja takvog intenziteta oksidativnog stresa sa kojim ćelije jetre očigledno ne mogu da se izbore, što onda vodi u ćelijsku smrt (Ryter i sar., 2007). Ovaj zaključak dodatno potvrđuju rezultati koji pokazuju da u uslovima redukovano oksidativnog stresa dolazi do značajnog smanjenja kako prisutnosti tako i degradacije PARP-1 proteina na nekrotske fragmente od 55 i 62 kDa. Naime, PARP-1 je jedan od ključnih proteina od čije aktivnosti zavisi da li će ćelija ići u pravcu preživljavanja ili smrti, apoptozom ili nekrozom. Hiperaktivacija PARP-1 proteina dovodi do progresivnog gubitka ATP i posledično do nekroze ćelije i pojave specifičnih nekrotskih fragmenata PARP-1 (Ha i Snyder, 1999). Ovi fragmenti su detektovani u ukupnim homogenatima jetre dijabetičnih pacova i

njihova se relativna prisutnost značajno smanjuje u uslovima melatoninom posredovanog smanjenja stepena oksidativnog stresa. Mehanizam delovanja aktiviranog PARP-1 proteina uključuje i njegov uticaj na relokalizaciju HMGB1 proteina iz jedra u citoplazmu ćelija (Ditsworth, i sar., 2007), što se postiže PARilacijom HMGB1 proteina (Ditsworth, i sar., 2007, Yang i sar., 2014). Zajedno sa uvećanim stepenom nekroze i uvećanim prisustvom PARP-1 proteina i njegovih nekrotskih fragmenata koji su posredni pokazatelji hiperaktivacije ovog proteina, u serumu dijabetičnih pacova detektovana je i uvećana prisutnost HMGB1 proteina i u serumu i u ćelijama jetre dijabetičnih pacova. Sa smanjenjem stepena oksidativnog stresa, tretmanom dijabetičnih pacova melatoninom, došlo je ne samo do snižavanja prisustva nekrotskih fragmenata PARP-1 proteina već i do značajnog smanjenja vanćelijskog nivoa HMGB1 proteina. Ovo smanjenje je u saglasnosti sa umanjnjim stepenom DNK oštećenja i stepenom nekroze kod ove eksperimentalne grupe.

Istraživanja su pokazala da apoptotske ćelije takođe mogu otpuštati HMGB1 protein u vanćelijsku sredinu (Bell i sar., 2006) kao i da autofagija može regulisati oslobađanje HMGB1 proteina (Thorburn i sar., 2009). Različiti načini oslobađanja HMGB1 proteina u vanćelijsku sredinu u zavisnosti od tipa ćelijske smrti nisu ni danas dobro definisani niti kako različit vid oslobađanja HMGB1 proteina utiče tiče na održavanje ovih procesa. Do sada, ipak, najveći broj prikupljenih podataka govori u prilog tome da neimune ćelije, poput onih u jetri, otpuštaju HMGB1 pasivnim putem kao posledica nekrotske smrti (Scaffidi i sar., 2002). Međutim, direktnom inhibicijom aktivnog oslobađanja HMGB1 proteina hroničnom primenom etil piruvata, nivo HMGB1 proteina u serumu dijabetičnih pacova je sveden na kontrolni nivo, što govori u prilog tome da i regulisano oslobađanje od strane apoptotskih ćelija ili ćelija u kojima je aktivirana autofagija imaju značajan uticaj na prisutnost HMGB1 u vanćelijskoj sredini.

U literaturi je poznato da oksidativni stres predstavlja vrlo značajan mehanizam regulacije translokacije HMGB1 proteina iz jedra u citoplazmu i njegovog oslobađanja van ćelije, kao i da dovodi do promena u aktivnosti HMGB1 proteina preko oksidativnih modifikacija specifičnih cisteinskih ostataka na pozicijama 23, 45 i 106 (Yang i sar., 2012). Smanjenjem oksidativnog stresa tretmanom dijabetičnih pacova melatoninom detektovano je značajno smanjenje prisustva vanćelijskog, ali i HMGB1 proteina u ćelijama jetre dijabetičnih pacova, što potvrđuje povezanost između

pomenutih događaja i ulogu HMGB1 proteina kao redoks senzora u ćeliji. Takođe, s obzirom na smanjenu prisutnost nekroze i oštećenja jetre, iz ovih rezultata se može zaključiti da se zaštitno dejstvo melatonina na jetru ogleda i u indirektnoj regulaciji lokalizacije i nivoa eksprimiranosti HMGB1 proteina. Tretman etil piruvatom iako je sprečio oslobađanje HMGB1 proteina nije imao toliko uticaja na promene nivoa ovog proteina u ćelijama jetre ali je doveo do smanjenja nivoa oštećenja jetre, što je pokazano smanjenjem prisustva transaminaza u serumu kao i očuvanom morfologijom ćelija jetre, što je detektovano elektronskom mikroskopijom. Iz ovoga proizilazi da, primarno, nivo HMGB1 proteina u vanćelijskoj sredini određuje sudbinu ćelija u nepovoljnim uslovima.

Prisustvo nekroze i njome izazvano uvećano prisustvo HMGB1 proteina u vanćelijskoj prooksidativnoj sredini u dijabetesu, omogućava ovom proteinu da parakrino učestvuje u različitim unutarćelijskim procesima, uključujući apoptozu i autofagiju. Da dijabetes dovodi do pojave apoptoze u jetri pokazano je od strane drugih autora (Paul i sar., 2009) ali i u okviru ove doktorske disertacije. Svoju ulogu u pomenutim procesima HMGB1 može da ostvaruje kroz interakciju sa RAGE i TLR4 receptorima koji su prisutni na površini, kako imunskih ćelija tako i parenhimskih ćelija jetre. Poznato je da u zavisnosti od oksidativnog stanja specifičnih cisteinskih ostataka HMGB1 proteina, zavisi i njegov afinitet prema ovim receptorima (Tang i sar., 2010b). Redukovani vanćelijski HMGB1 se vezuje primarno za RAGE ali ne i za TLR4 receptore, i aktivira Beklin1-zavisnu autofagiju, dok oksidovani HMGB1 ima afinitet prema TLR4 receptorima preko kojih pokreće signalnu kaskadu koja rezultuje aktivacijom unutrašnjeg, mitohondrijalnog puta apoptoze. Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da u jetri dijabetičnih pacova dolazi do značajnog uvećanja nivoa interakcija vanćelijskog HMGB1 proteina i sa TLR4 i sa RAGE receptorima. Poznato je da interakcija HMGB1 sa TLR4 receptorima dovodi do uvećanog stepena fosforilacije JNK kinaze koja je neophodna za njenu aktivaciju (Ding i sar., 2013). Aktivirana JNK kinaza promovise unutrašnji put aktivacije apoptoze jer dovodi do translokacije Bax proteina na mitohondrije i posledično, do oslobađanja citohroma C u citoplazmu i aktivacije efektorske kaspaze 3 koja vodi do apoptoze. U ovoj disertaciji je pokazano da porast u interakciji vanćelijskog HMGB1 proteina sa TLR4 dovodi do porasta aktivnosti JNK kinaze i aktivacije unutrašnjeg

mitohondrijalnog puta apoptoze. Ali, pored JNK kinaze, ligand-zavisna aktivacija TLR4 receptora reguliše i aktivnost Akt kinaze koja aktivira puteve preživljavanja tako što inhibira translokaciju Bax proteina na mitohondrije (Boucher i sar., 2014) i uvećava transkripciju gena za Bcl-2 (Pugazhenthii i sar., 2000). Pojedine studije su pokazale da TLR4 aktivira Akt kinazu i nizvodni signalni put koji vodi preživljavanju malignih ćelija različitih tipova kancera (Doan i sar., 2009, Yesudhas i sar., 2014) dok su drugi istraživači pokazali da aktivacija TLR4 receptora dovodi do pada u fosforilaciji, odnosno aktivnosti Akt kinaze, što rezultira uvećanim stepenom apoptoze u ćelijama jetre pacova nakon tretmana bakterijskim lipopolisaharidom (Zhang i sar., 2015). Ovakva dualnost u regulaciji Akt kinaze bi se mogla objasniti različitim model sistemima kao i različitim tkivima na kojima su ispitivanja vršena. Takođe poznato je da aktivirani putevi pokrenuti sa TLR4 receptora u mnogome zavise od tipa liganda koji se za receptore vezao (Erridge, 2010). Vanćelijski HMGB1, vezivanjem za TLR4, potencira aktivaciju JNK kinaze i apoptozu u eksperimentalnom modelu ishemije i reperfuzije srca koja dovodi do pojave oksidativnog stresa (Ding i sar., 2013, Ding i sar. 2013), a smanjenjem prisutnosti HMGB1 u serumu se smanjuje povreda srca preko uvećanja aktivacije Akt signalnog puta (Zhu i Fang 2011). Sadi i sar. (2015) su pokazali da u ćelijama jetre pacova kojima je dijabetično stanje izazvano STZ-om dolazi do pada u fosforilaciji Akt proteina što je u korelaciji sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Kako je dijabetes stanje u kome preovlađuje oksidativni stres, a pad u aktivnosti Akt kinaze je blisko povezana sa uvećanim stepenom ćelijske smrti apoptozom u uslovima oksidativnog stresa (Maiese, 2007), moglo bi se zaključiti da u jetri pacova tokom dijabetesa, HMGB1/TLR4 interakcija favorizuje JNK signalni put i aktivaciju apoptoze, a sa druge strane ima inhibitorno dejstvo na Akt signalni put i preživljavanje ćelija. Ovo je i potvrđeno detektovanom promenom u ravnoteži odnosa Bax i Bcl-2 proteina. Poznato je da od Bax/Bcl-2 odnosa zavisi da li će ćelija preživeti ili ući u proces ćelijskog umiranja apoptozom (Neuman, 2001). U jetri dijabetičnih pacova ovaj je odnos pomeren u pravcu pro-apoptotskih proteina. Potvrda ovakvom zaključku jeste i da sa snižavanjem stepena oksidativnog stresa tretmanom melatoninom, smanjuje apoptotska aktivnosti u jetri dijabetičnih pacova. U literaturi je poznato da melatonin poseduje anti-apoptotsko dejstvo, ali molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju aktivnosti apoptoze melatoninom su i dalje nedovoljno poznati

(Radogna i sar., 2010; Singhal i sar., 2011). U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da tretman melatoninom indirektno, preko stišavanja oksidativnog stresa, smanjuje prisustvo vanćelijskog HMGB1 što rezultuje značajnim umanjnjem interakcije HMGB1 proteina sa TLR4 receptorima u jetri dijabetičnih pacova. Smanjenje ove interakcije odrazilo se na stišavanje apoptoze pokrenutim JNK kinazom, što je i vizuelno detektovano. Sa druge strane, došlo je do uvećanja u fosforilaciji Akt kinaze čime se Bax/Bcl-2 ravnoteža pomerila u pravcu preživljavanja. Iz priloženog se može zaključiti da se anti-apoptotsko dejstvo melatonina u jetri dijabetičnih pacova ostvaruje i preko uticaja na nivo interakcija HMGB1 proteina sa TLR4. Konačan zaključak o ulozi HMGB1 proteina u aktivaciji apoptoze je dobijen tretiranjem dijabetičnih životinja etil piruvatom čime se gotovo u potpunosti sprečilo oslobađanje HMGB1 proteina u vanćelijsku sredinu što je značajno smanjilo nivo HMGB1/TLR4 interakcija, JNK aktivnost, Bax/Bcl-2 odnos za oko 50%, dok je Akt aktivnost ostala skoro na kontrolnom nivou. Usled ovakvih promena došlo je do značajnog stišavanja unutrašnjeg puta apoptoze u jetri dijabetičnih pacova. Dobijeni rezultati su jasan pokazatelj da u stanjima u kome je prisutan oksidativni stres, vanćelijski prisutan HMGB1 protein predstavlja jedan od ključnih aktivatora apoptoze u jetri pacova.

Prisustvo apoptoze u jetri pacova sa dijabetesom analizirano je preko prisustva apoptotskog fragmenta PARP-1 proteina. Kako je već u uvodu rečeno (Lazebnik i sar., 1994), PARP-1 se inaktivira sečenjem na fragment od 89 kDa u ranim koracima apoptoze od strane aktivirane kaspaze 3, kako bi se sprečio nepotreban gubitak ATP-a izazvan nekontrolisanom aktivnošću ovog enzima. Kako HMGB1 dovodi do aktivacije unutrašnjeg mitohondrijalnog puta apoptoze i prevođenja neaktivne prokaspaze 3 u aktivnu formu, kaspazu 3 kojoj je PARP-1 supstrat delovanja, moguće je da PARP-1 i vanćelijski prisutan HMGB1 imaju negativno regulisan odnos. Poznato je da uvećana aktivnost PARP-1 proteina dovodi do oslobađanja HMGB1 iz umiruće ćelije tako što ga modifikuje PARilacijom (Yang i sar., 2014), a kako vanćelijski HMGB1 preko TLR4 receptora aktivira mitohondrijalni put apoptoze može se pretpostaviti da oslobođeni HMGB1 ima ulogu u ograničavanju preterane aktivnosti PARP-1 koji može dovesti do nekroze. Moguće je da na ovaj način HMGB1 protein reguliše ravnotežu između nekroze i apoptoze u korist apoptoze čime se menja profil ćelijske smrti iz nekontrolisanog u regulisan, programiran tip, čime bi se makar delimično utišala

oksidativnim stresom uslovljena inflamacija u jetri tokom trajanja dijabetesa. Ovakva pretpostavka je interesantna jer se, do sada, prisustvo HMGB1 u vanćelijskoj sredini uglavnom povezivalo sa održavanjem inflamacije (Wang i sar., 2004) dok ovi rezultati navode na njegovu ulogu u njenom stišavanju. Tretmani melatoninom ili etil piruvatom, kojima je postignuto indirektno ili direktno smanjenje prisustva vanćelijskog HMGB1 proteina u jetri pacova sa dijabetesom, doveli su do značajnog pada u prisustvu apoptotskog fragmenta PARP-1 proteina. Iz ovako dobijenih rezultata se može pretpostaviti da HMGB1 kroz regulaciju unutrašnjeg puta apoptoze ima udela u kontroli energetskog statusa ćelija jetre kroz inaktivaciju PARP-1 proteina.

Sa druge strane, autofagija može imati značajnu ulogu u preživljavanju ćelija u uslovima oksidativnog stresa jer uklanja oštećene mitohondrije koje su najveći izvor ROS u ćeliji (Green i sar., 2011). Ovo je od posebnog značaja za jetru, jer razni poremećaji funkcionalnosti ovog organa nastaju usled akumulacije disfunkcionalnih mitohondrija i uvećane produkcije ROS (Martel, 2012), što dovodi do ćelijske smrti i postepeno do disfunkcije organa.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivali smo prisustvo autofagije korišćenjem različitih pristupa. Njeno prisustvo u jetri dijabetičnih pacova potvrdili smo korišćenjem elektronske mikroskopije, a stepen njene aktivacije i funkcionalnog značaja preko određivanja nivoa LC3-II proteina, kombinacije prisustva ovog proteina i p62, i kroz interakcije Beklin1 proteina sa citoplazmatskim HMGB1 proteinom. Ovi pristupi su odabrani zbog istraživanja Tanga i sar. (2011b) koji su pokazali da HMGB1 protein utiče, makar delimično, na nivo autofagije regulišući LC3-II ekspresiju, degradaciju p62 i sazrevanje autofagozoma. Tokom sazrevanja autofagozoma LC3-II sa spoljašnje membrane autofagozoma biva isečen i recikliran, dok onaj na unutrašnjoj membrani, zajedno sa citoplazmatskim komponentama koje okružuju autofagozom, biva degradovan u lizozomima. Protein p62 je ubikvitin vezujući protein za koga je pokazano da kolokalizuje sa ubikvitinisanim proteinskim agregatima u mnogim neurodegenerativnim bolestima i proteinopatijama u jetri (Bjorkoy i sar., 2009). Ovaj protein je lokalizovan na autofagozomima preko interakcija sa LC3-II i tokom autofagije biva konstantno degradovan od strane autofagolizozomalnog sistema (Komatsu i Ichimura, 2010). Posledično, aktivacija autofagije vodi padu prisustva p62 proteina, dok njegova eventualna akumulacija ukazuje na prisustvo narušene ili

defektne autofagije i smanjenje njene aktivnosti. Prema Klionskom i sar. (2012), LC3-II nivo prisutnosti sam po sebi, ne mora striktno da ukazuje na aktivaciju autofagije. Više je straživanja , uključujući i ono na jetri pacijenata sa nealkoholnom masnom jetrom (González-Rodríguez i sar., 2014) koja su pokazala da prisustvo defektne ili inhibirane autofagije prati uvećano prisustvo i LC3-II i proteina p62. Iz ovog razloga je sugerisano da bi kombinacija proteinskog nivoa oba ova proteina mogla da reflektuje stvarnu aktivaciju autofagije.

U okviru ove doktorske disertacije detektovano je značajno uvećano prisustvo LC3-II forme proteina u ćelijama jetre dijabetičnih pacova. Takođe, detektovana je i uvećana prisutnost HMGB1 proteina u citoplazmi ćelija jetre što je ukazivalo da ovaj protein može da koordiniše formiranje autofagozoma kroz interakciju sa Beklin1 proteinom (Kang i sar., 2010). Međutim, da bi do interakcije između ova dva proteina došlo, neophodno je da Beklin1 bude oslobođen od svog inhibitorynog partnera, Bcl-2 proteina. Jedan od mehanizama raskidanja veze između ova dva proteina je fosforilacija Bcl-2 proteina indukovana od strane ERK kinaze koja se može aktivirati aktivacijom RAGE receptora nakon vezivanja vanćelijskog HMGB1 proteina (Thang i sar., 2010a). U ovoj disertaciji pokazano je da uvećana interakcija vanćelijskog HMGB1 proteina sa RAGE receptorima dovodi do uvećane fosforilacije, odnosno aktivacije ERK kinaze što je praćeno oslobađanjem Beklina1 od Bcl-2 proteina i uvećanjem Beklin1 interakcija sa citoplazmatskim HMGB1 proteinom. Tang i sar. (2011b) su pokazali da prisustvo HMGB1 u citoplazmi ćelija dovodi do sećenja LC3 proteina u LC3-II formu koja se ugrađuje u membranu autofagozoma. Potvrda ovome jeste podatak da nedostatak HMGB1 u citoplazmi u uslovima oksidativnog stresa dovodi do inhibicije formiranja LC3-II forme proteina (Tang i sar., 2011b). Isti autori su pokazali da je akumulacija p62 proteina prisutna u onim ćelijama u kojima je autofagija umanjena ili inhibirana. Protein p62 se preko LC3-II proteina vezuje za membranu autofagozoma, a sa druge strane se kovalentno vezuje za ćelijski sadržaj koji je označen za degradaciju u autofagolizozomima, i usled toga je jedan od prvih pokazatelja aktivne lizosomalne degradacije u procesu autofagije jer među prvima biva degradovan u ovim organelama (Bjorkoy i sar., 2009). Međutim, iako je u ćelijama jetre dijabetičnih pacova došlo do akumulacije LC3-II forme kao i do interakcije citoplazmatskog HMGB1 sa Beklin1 proteinom, oštećenja jetre nisu sprečena niti umanjena. Kada se analizirala ekspresija

p62 u ovoj eksperimentalnoj grupi primećeno je da ne dolazi do pada u nivou ovog proteina u citoplazmi, već da je njegova ekspresija blago povišena u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost da je autofagija u jetri dijabetičnih pacova poremećena ili defektna što može da vodi nagomilavanju oštećenih proteina i organela, apoptotskoj smrti i uvećanju oštećenja jetre. Ovakav zaključak je u saglasnosti sa detektovanim promenama u jetri pacova sa dijabetesom i objašnjava visok nivo prisutnosti apoptotske smrti. Moguće objašnjenje leži u proteolitičkom sečenju Beklin1 proteina. Novija istraživanja su pokazala da Beklin1, takođe predstavlja supstrat za kaspazu 3. Kaspaza 3 seče Beklin1 na apoptotske fragmente od 37 i 35 kDa koji ne poseduju potencijal da indukuju autofagiju ali su u stanju da pojačaju apoptotski signal relokalizacijom u mitohondrije gde omogućavaju oslobađanje citohroma C (Wirawan i sar., 2010). U ovoj disertaciji je pokazano značajno uvećano prisustvo dodatnih fragmenata Beklin1 proteina u citoplazmi ćelija jetre dijabetičnih pacova koji su odgovarajuće molekulske mase kao specifični apoptotski fragmenti ovog proteina. Ovi detektovani fragmenti bi mogli biti rezultat proteolitičke degradacije Beklin1 proteina od strane kaspaze 3 čime se smanjuje njegova sposobnost da inicira autofagiju. Dodatno, analiza protein-protein interakcija je pokazala da do interakcije sa HMGB1 dolazi samo između intaktnog Beklin1 proteina, što ukazuje na to da bez obzira što je došlo do akumulacije HMGB1 proteina u citoplazmi ćelija jetre dijabetičnih pacova, apoptotsko sečenje Beklin1 smanjuje nivo interakcija sa dostupnim citoplazmatskim HMGB1 proteinom i verovatno i sa drugim proteinima koji učestvuju u inicijaciji autofagije. Ovakve promene najverovatnije dovode do smanjenja nivoa funkcionalne autofagije i njenog citoprotektivnog dejstva tokom dijabetesa. Potvrda ovakvoj hipotezi je i to, da iako dolazi do početnih koraka u inicijaciji autofagije koja se ogleda u sečenju LC3-I proteina u LC3-II formu, u ćelijama jetre dijabetičnih pacova detektovani su sporadični autofagozomi koji najverovatnije nisu dovoljni da spreče pojavu funkcionalnih i strukturnih oštećenja jetre u dijabetesu. Kako HMGB1 preko interakcije sa TLR4 receptorima dovodi do aktivacije unutrašnjeg apoptotskog puta i kaspaze 3, moglo bi se zaključiti da i pored interakcije vanćelijskog HMGB1 proteina sa RAGE receptorima koja vodi do inicijacije autofagije, HMGB1/TLR4 interakcija u ćelijama jetre dijabetičnih pacova negativno reguliše aktivaciju ovog procesa kroz favorizovanje apoptotskog sečenja Beklin1 proteina.

Smanjenje oksidativnog stresa tretmanom dijabetičnih pacova melatoninom dovelo je do značajnog pada u interakciji vanćelijskog HMGB1 sa TLR4 receptorima ali ne i sa RAGE receptorima u jetri dijabetičnih pacova. Ovakve promene su najverovatnije u vezi sa redoks stanjem HMGB1 proteina prisutnog u vanćelijskoj sredini, gde smanjenje prisustva ROS najverovatnije dovodi do promena u odnosu između redukovane i oksidovane forme HMGB1, uvećavajući prisustvo redukovanog HMGB1 proteina koji interaguje samo sa RAGE receptorima. Usled neizmenjene reakcije HMGB1 sa RAGE receptorima u uslovima umanjenog oksidativnog stresa, aktivnost ERK kinaze se nije promenila u poređenju sa dijabetičnim pacovima i omogućavala je disocijaciju Bcl-2 proteina sa Beklin1 i nesmetanu interakciju između Beklin1 i HMGB1 proteina. Takođe, iako je došlo do izvesnog smanjenja u nivou citoplazmatskog HMGB1 proteina u poređenju sa dijabetičnim pacovima, njegov nivo je i dalje ostao značajno povišen u poređenju sa kontrolom što se može objasniti kroz redoks status 3 cisteinska ostatka ovog proteina. U uslovima blagog oksidativnog stresa, cisteini na poziciji 23 i 45 formiraju disulfidni most, dok cistein na poziciji 106 ostaje redukovano. Mutacija cisteina na ovoj poziciji dovodi do pada u aktivaciji autofagije kada se poredi sa neizmenjenim HMGB1 proteinom čiji je cistein na poziciji 106 redukovano (Tang i sar., 2010b) Isti autori su pokazali da je blag oksidativni stres značajan za translokaciju HMGB1 iz jedra u citoplazmu i da ovakav semi-oksidovan HMGB1 protein učestvuje u inicijaciji autofagije zavisne od Beklin1 proteina. Ovo može poslužiti kao objašnjenje zašto se HMGB1 zadržava u citoplazmi ćelija jetre dijabetičnih pacova uprkos smanjenju stepena oksidativnog stresa. Kako tretman sa melatoninom dovodi do smanjenja apoptotskog signala posredovanog HMGB1/TLR4 interakcijom, dok je signal za aktivaciju autofagije posredovan interakcijom HMGB1 sa RAGE i dalje prisutan, čak i u većoj meri kod dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom, dolazi do promene ravnoteže između ova dva procesa. Kao rezultat ovakvih događaja smanjuje se odnos apoptoze prema autofagiji i favorizuje se preživljavanje nepovoljnih uslova. U prilog ovome govore i promene u aktivnosti kaspaze 3 u jetri dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom koja je značajno smanjena, što je smanjilo i sečenje Beklin1 proteina obzirom da se u citoplazmi jetre dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom nisu detektovali dodatni fragmenti ovog proteina. Stoga je inicijacija autofagije kroz interakciju HMGB1 i Beklin1 proteina mogla nesmetano da

se odvija što je i potvrđeno imunoprecipitacionom i kolokalizaciinom analizom. U isto vreme detektovano je i značajno smanjeno prisustvo p62 proteina u ćelijama jetre što govori u prilog postojanja aktivne degradacije ćelijskih komponenti u procesu autofagije. Konačno, elektronska mikrofografija jetre dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom ukazuje na uvećano prisustvo autofagozoma koji selektivno uklanjaju oštećene mitohondrije. Kako su oštećenje mitohondrije glavni unutarćelijski izvor ROS, njihovim uklanjanjem kroz aktivaciju i održavanje autofagije kao citoprotektivnog mehanizma se održava normalna struktura i funkcija ćelija jetre u blažim uslovima oksidativnog stresa.

Poznato je da melatonin ima i aktivnu ulogu u modulaciji autofagije, bilo kao inhibitor ili aktivator, zavisno od korišćenog model sistema (Eşrefoğlu i sar., 2006), međutim mehanizmi koji leže u osnovi regulacije aktivnosti autofagije melatoninom nisu u potpunosti razjašnjeni. Luchetti i sar. (2009) su pokazali da se anti-apoptotsko dejstvo melatonina u U937 ćelijskoj liniji ogleda u održavanju aktivnosti ERK signalnog puta kao citoprotektivnog mehanizma i stišavanju aktivnosti JNK kinaze. Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da u ćelijama jetre dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom, usled stišavanja HMGB1 interakcije sa TLR4 receptorima, a održavanjem HMGB1/RAGE interakcija, dolazi do istih promena koje su zabeležili Luchetti i sar. u svom model sistemu. Literaturni podaci zajedno sa dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji navode na zaključak da se zaštitno dejstvo melatonina u uslovima oksidativnog stresa koji vladaju u dijabetesu, pored direktnog uklanjanja ROS, ogleda i u stišavanju apoptoze preko stišavanja aktivnosti JNK kinaze koja je posredovana HMGB1/TLR4 interakcijama, i u aktivaciji protektivne autofagije, pogotovo mitofagije, kroz favorizovanje HMGB1/RAGE interakcija.

U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da tretman dijabetičnih pacova etil piruvatom skoro u potpunosti inhibira oslobađanje HMGB1 proteina kod dijabetičnih pacova. Usled toga, nivo interakcija HMGB1 kako sa TLR4 tako i sa RAGE receptorima je na nivou koji se detektuje u jetri kontrolnih pacova. Nivo citoplazmatskog HMGB1 ostao je neizmenjen u poređenju sa dijabetičnim pacovima, ali su stišani putevi kako apoptoze tako i autofagije što je dodatan pokazatelj da vanćelijski prisutan HMGB1 protein ima ključnu ulogu u modulaciji ova dva procesa u jetri. Međutim, nivo aktivacije ERK kinaze u jetri dijabetičnih pacova tretiranih sa etil

piruvatom , iako snižen u odnosu na dijabetičnu grupu, i dalje je bio značajno povišen u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je interakcija između Bcl-2 i Beklin1 proteina izraženija nego kod dijabetičnih pacova. Kako interakcija između Beklin1 i Bcl-2 proteina dovodi do umanjenog stepena interakcije Beklin1 sa citoplazmatskim HMGB1 proteinom, to ukazuje na postojanje i drugog mogućeg puta regulacije aktivacije autofagije u jetri dijabetičnih pacova. Podaci iz literature govore da pored ERK kinaze, u fosforilaciji Bcl-2 proteina može učestvovati i JNK kinaza (Yamamoto i sar., 1999). Tretman etil piruvatom je u jetri dijabetičnih pacova preko inhibicije oslobađanja HMGB1 i interakcije ovog proteina sa TLR4 značajno smanjio aktivnost JNK kinaze i doveo aktivnost Akt kinaze na kontrolni nivo što najverovatnije menja ravnotežu u pravcu stišavanja procesa ne samo apoptoze već i autofagije. Ovi rezultati ukazuju na to, da ne samo HMGB1 koji se vezao za RAGE, već i frakcija vezana za TLR4, može da utiče na stepen aktivacije autofagije.

Literaturni podaci govore u prilog činjenici da Bcl-2 protein pored anti-apoptotske uloge ima značajnu ulogu u inhibiciji procesa autofagije jer sprečava interakciju citoplazmatskog HMGB1 proteina sa Beklin1 (Zhou i sar., 2010). Kako je fosforilacija Bcl-2 u dijabetesu , prema dobijenim rezultatima u okviru ove disertacije, najverovatnije regulisana aktiviranim signalnim putevima pokrenutih interakcijama vanćelijskog HMGB1 proteina kako sa RAGE tako i sa TLR4 receptorima, može se zaključiti da vanćelijski prisutan HMGB1 protein ima vrlo značajnu ulogu u regulaciji aktivacije autofagije kako negativno, jer kroz aktivaciju kaspaze 3 inicira sečenje Beklin1 proteina na apoptotske fragmente, tako i pozitivno, jer preko receptora omogućava disocijaciju inhibitornog Bcl-2 proteina sa Beklin1. Usled toga citoplazmatski prisutan HMGB1 može, kroz interakciju sa Beklin1 proteinom, započeti proces formiranja autofagozoma.

Dodatno objašnjenje za smanjenu aktivnosti mitofagije u jetri dijabetičnih pacova koji su tretirani etil piruvatom možda leži i u tome da je sam etil piruvat doveo do pada u prisustvu intaktnog Beklin1 proteina kao i do pada u nivou LC3-II forme, pa pored pojačane interakcije sa Bcl-2 smanjila se i frakcija Beklin1 proteina koja kroz interakcije sa citoplazmatskim HMGB1 može učestvovati u formiranju autofagozoma, što rezultuje u smanjenom broju ovih organela. Slične rezultate su dobili i Shen i saradnici (2013) koji su ispitivali uticaj etil piruvata u jetri nakon ishemije i reperfuzije.

Stišavanje autofagije i u ovom slučaju je bilo praćeno padom u nivou Beklin1 i LC3-II proteina kao i izostankom signalizacije sa HMGB1/RAGE. Međutim, i u jetri dijabetičnih pacova tretiranih etil piruvatom dolazi do interakcije citoplazmatskog HMGB1 sa Beklin1 proteinom iako su spoljašnji signalni putevi aktivirani vanćelijski prisutnim HMGB1, koji favorizuju ovu interakciju, utišani. Moguće objašnjenje leži u tome da se nivo citoplazmatskog HMGB1 proteina u ćelijama jetre dijabetičnih životinja tretiranih etil piruvatom nije smanjio u odnosu na netretirane dijabetične pacove. Visok nivo prisutnog HMGB1 u citoplazmi može ući u direktnu kompeticiju sa Bcl-2 za vezivna mesta na Beklin1 proteinu bez ikakvih posttranslacionih modifikacija (Kang i sar., 2011) i inicirati početne korake u aktivaciji procesa autofagije. Kako su i u jetri dijabetičnih pacova tretiranih etil piruvatom detektovani autofagozomi koji uklanjaju oštećenje mitohondrije može se pretpostaviti da prisustvo aktivne mitofagije kod ovih životinja govori o značajnosti ovog procesa u očuvanju ćelija jetre u uslovima oksidativnog stresa u dijabetesu.

Rezultati iz ove doktorske disertacije ukazuju na to da od lokalizacije i interakcija HMGB1 proteina zavisi i njegov doprinos u procesima apoptoze i autofagije. HMGB1 učestvuje u aktivaciji unutrašnjeg puta apoptoze preko interakcije sa TLR4 receptorima i doprinosi ćelijskom umiranju što dovodi do oštećenja jetre dok kroz stimulaciju selektivne mitofagije HMGB1 kroz interakcije sa RAGE u vanćelijskoj sredini i sa Beklin1 proteinom u citoplazmi ima citoprotektivnu ulogu. Ravnoteža ova dva procesa pokrenuta istim proteinom diktira sudbinu ćelija jetre tokom dijabetesa. Odnos u aktivaciji ova dva procesa pokrenuta HMGB1 proteinom zavisi od stepena oksidativnog stresa. U uslovima jaćeg, hroničnog oksidativnog stresa koji je prisutan u dijabetesu vanćelijski HMGB1 favorizuje apoptozu naspram autofagije dok u uslovima blaćeg favorizuje citoprotetivnu autofagiju. Kako je u svrhu snižavanja oksidativnog stresa korišćen melatonin moguće je da je modulacija HMGB1 aktivnosti u procesima apoptoze i autofagije mehanizam preko koga melatonin istovremeno inhibira apoptozu a stimuliše autofagiju u ćemu se, makar delom, ogleda njegova zaštitna uloga u jetri tokom dijabetesa. Tretman etil piruvatom je pokazao da pored HMGB1/RAGE interakcije i HMGB1/TLR4 interakcija ima dvojaku ulogu u modulaciji autofagije. Sa jedne strane inhibira inicijaciju ovog procesa kroz favorizovanje sećenja Beklin1 proteina na fragmente, a sa druge strane učestvuje u njegovom oslobađanju od

inhibitora Bcl-2 proteina kroz favorizovanje njegove fosforilacije JNK kinazom. Ovi rezultati prvi put ukazuju na to da u modulaciji autofagije ne učestvuje isključivo HMGB1 protein vezan za RAGE već i frakcija koja je vezana za TLR4 receptore. Takođe tretman dijabetičnih životinja etil piruvatom je ukazao da citoplazmatski HMGB1 može direktno inicirati aktivaciju funkcionalne protektivne autofagije (mitofagije) kroz kompeticiju sa Bcl-2 za vezivanje za Beklin1 protein.

Iako se HMGB1 smatra vrlo interesantnim kao meta za terapiju različitih patoloških stanja, njegova značajna uloga u poremećajima jetre je tek u skorije vreme privukla pažnju. Rezultati iz ove doktorske disertacije ukazuju na to da vanćelijsko prisustvo kao i moguće redoks stanje HMGB1 proteina igra bitnu ulogu u balansu između apoptoze i autofagije u uslovima oksidativnog stresa, što može imati bitan uticaj u ravnoteži između ćelijske smrti i preživljavanja ćelija jetre u bolestima u čijoj osnovi leži oksidativni stres kao što je to slučaj sa dijabetesom.

6. ZAKLJUČCI

1. Jetru pacova sa dijabetesom, koji je indukovao streptozotocinom, karakterišu morfološke i funkcionalne promene, prisustvo oksidativnog stresa, uvećan stepen DNK oštećenja, smrt ćelija nekrozom i apoptozom i defektna autofagija. Navedene promene su u korelaciji sa uvećanim prisustvom HMGB1 proteina u serumu i jetri i njegovom akumulacijom u citoplazmi ćelija.
2. Hronični tretman pacova sa dijabetesom melatoninom kao antioksidansom, indirektno smanjuje nivo HMGB1 proteina u serumu, jetri i citoplazmi ćelija, što je praćeno normalizacijom strukture i funkcije jetre, smanjenjem DNK oštećenja, značajnim smanjenjem prisustva ćelijske smrti nekrozom i apoptozom, i uvećanim prisustvom protektivne autofagije, odnosno mitofagije.
3. Hronični tretman pacova sa dijabetesom etil piruvatom, kao inhibitorom oslobađanja HMGB1 proteina iz ćelija, značajno smanjuje nivo HMGB1 proteina u serumu i jetri što je praćeno normalizacijom strukture i funkcije jetre, smanjenjem aktivnosti unutrašnjeg apoptotskog puta i autofagije.
4. Aktivnost unutrašnjeg puta apoptoze u jetri pacova sa dijabetesom zavisi od stepena prisutnog oksidativnog stresa, nivoa vanćelijskog HMGB1 proteina i njegovih interakcija sa TLR4 receptorom na površini ćelija kojima se reguliše aktivacija JNK kinaze i signalnog puta koji vodi aktivaciji kaspaze 3.
5. Prisustvo defektne autofagije u jetri pacova sa dijabetesom najverovatnije je rezultat smanjenja nivoa funkcionalnog Beklin1 proteina i njegovih interakcija sa citoplazmatskim HMGB1 proteinom, usled proteolitičkog sećenja Beklin1 kaspazom 3 koja se delom aktivira signalnim putevima pokrenutim interakcijom HMGB1 proteina sa TLR4.
6. Smanjenje nivoa oksidativnog stresa u jetri pacova sa dijabetesom, i pored smanjenja nivoa vanćelijskog HMGB1 proteina, dovodi do povećanja

interakcija prisutnog HMGB1 sa RAGE receptorima i smanjenja interakcija sa TLR4. Ovo vodi smanjenoj aktivaciji kaspaze 3, apoptozi i sečenju Beklin1, i omogućava da aktivirana ERK kinaza sa RAGE receptora oslobodi Beklin1 od njegovog inhibitora Bcl-2 proteina i učini ga funkcionalnim za interakcije sa citoplazmatskim HMGB1 proteinom i za formiranje autofagozoma.

7. U regulaciji aktivacije autofagije u jetri pacova sa dijabetesom HMGB1 protein učestvuje na dva načina: kroz interakcije vanćelijskog HMGB1 sa RAGE i TLR4 i aktivaciju nizvodnih signalnih puteva koji se ukrštaju i kroz interakcije citoplazmatskog HMGB1 sa Beklin1 proteinom.

8. Na osnovu molekularnih mehanizama delovanja vanćelijskog i citoplazmatskog HMGB1 proteina može se zaključiti da najveći uticaj na modulaciju odnosa između apoptoze i autofagije, odnosno profil ćelijske smrti u jetri pacova sa dijabetesom, ima vanćelijski HMGB1, što ovaj protein čini potencijalnom terapijskom metom.

9. Oksidativnim stresom uslovljene interakcije HMGB1 proteina sa RAGE i TLR4 receptorima govore u prilog postojanja oksidativnih modifikacija na HMGB1 proteinu i upućuje na zaključak da od njegovog redoks stanja zavisi i njegov doprinos ćelijskoj smrti i/ili preživljavanju u jetri tokom dijabetesa. Veće prisustvo oksidativnog stresa, i najverovatnije veće prisustvo oksidovanog HMGB1 proteina, čini da HMGB1 favorizuje aktivaciju apoptoze naspram autofagije, dok u uslovima slabog oksidativnog stresa i većeg prisustva redukovanog HMGB1, HMGB1 favorizuje protektivnu autofagiju.

7. LITERATURA

- Abd El-Kader, S.M., and El-Den Ashmawy, E.M.S. (2015). Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J. Hepatol.* 7, 846–858.
- Ahmed, N., Thornalley, P.J., Luthen, R., Haussinger, D., Sebekova, K., Schinzel, R., Voelker, W., and Heidland, A. (2004). Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J. Hepatol.* 41, 913–919.
- Andrabi, S.A., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 233–241.
- Andrassy, M., Volz, H.C., Igwe, J.C., Funke, B., Eichberger, S.N., Kaya, Z., Buss, S., Autschbach, F., Pleger, S.T., Lukic, I.K., et al. (2008). High-Mobility Group Box-1 in Ischemia-Reperfusion Injury of the Heart. *Circulation* 117, 3216–3226.
- Anwar, M.M., and Meki, A.-R.M.A. (2003). Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 135, 539–547.
- Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. (2005). Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett.* 579, 3287–3296.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- Asmat, U., Abad, K., and Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* 24, 547–553.
- Atkinson, M.A. (2012). The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp 123–132
- Avery, S. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 434, 201–210.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685–701.

- Backer, J. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* 410, 1–17.
- Baehrecke, E.H. (2005). Opinion: Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 505–510.
- Baggetto, L.G. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74, 959–974.
- Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., LeFeuvre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005). Cleavage of the Plasma Membrane Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in Excitotoxicity. *Cell* 120, 275–285.
- Barth, S., Glick, D., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* 221, 117–124.
- Bell, C.W., Jiang, W., Reich, C.F., and Pisetsky, D.S. (2006). The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *AJP Cell Physiol.* 291, C1318–C1325.
- Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandennebeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.
- Beutler, E. (1982). Catalase. In: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, Inc. 105 – 106
- Bhagal, R.H., Curbishley, S.M., Weston, C.J., Adams, D.H., and Afford, S.C. (2010). Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. *Liver Transplant.* 16, 1303–1313.
- Bianchi, M.E., and Beltrame, M. (2000). Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep.* 1, 109–114.
- Bianchi, M.E., Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtländer, T., Ferrier, P., and Ferrari, S. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.* 22, 276–280.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In *Methods in Enzymology*, pp. 181–197.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22, 5551–5560.

- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21–26.
- Bouchard, V.J., Rouleau, M., and Poirier, G.G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 31, 446–454.
- Bouchard, V.J., Rouleau, M., and Poirier, G.G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 31, 446–454.
- Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a009191–a009191.
- Brennan, M.A., and Cookson, B.T. (2000). Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* 38, 31–40.
- Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2013). Decoding cell death signals in liver inflammation. *J. Hepatol.* 59, 583–594.
- Bridgeman, M.M.E., Marsden, M., Macnee, W., Flenley, D.C., and Ryle, A.P. (1991). Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. *Thorax* 46, 39–42.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Burnette, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- Burton, G.J., and Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 287–299.
- Busik, J. V, Mohr, S., and Grant, M.B. (2008). Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57, 1952–1965.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79–110.
- Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 139–149.
- Cannio, R., Fiorentino, G., Morana, A., Rossi, M., and Bartolucci, S. (2000). Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress. *Front. Biosci.* 5, D768-79.

- Castino, R., Fiorentino, I., Cagnin, M., Giovia, A., and Isidoro, C. (2011). Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. *Toxicol. Sci.* 123, 523–541.
- Chan, D.C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annu. Rev. Genet.* 46, 265–287.
- Chen, H., Yoshioka, H., Kim, G.S., Jung, J.E., Okami, N., Sakata, H., Maier, C.M., Narasimhan, P., Goeders, C.E., and Chan, P.H. (2011). Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1505–1517.
- Chen, R., Hou, W., Zhang, Q., Kang, R., Fan, X.-G., and Tang, D. (2013). Emerging role of high-mobility group box 1 (HMGB1) in liver diseases. *Mol. Med.* 19, 357–366.
- Chinnaiyan, A.M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1, 5–15.
- Choi, H.K., and Waxman, D.J. (1999). Growth hormone, but not prolactin, maintains, low-level activation of STAT5a and STAT5b in female rat liver. *Endocrinology* 140, 5126–5135.
- Choi, K.-C., Kim, S.-H., Ha, J.-Y., Kim, S.-T., and Son, J.H. (2010). A novel mTOR activating protein protects dopamine neurons against oxidative stress by repressing autophagy related cell death. *J. Neurochem.* 112, 366–376.
- Cilenšek, I., Mankoč Ramuš, S., Globočnik Petrovič, M., and Petrovič, D. (2016). Oxidative Stress Biomarkers for Diabetic Retinopathy and Medical Management Affecting Oxidative Stress. In *Role of Biomarkers in Medicine*, (InTech), p.
- Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762.
- Cooke, D.W., and Plotnick, L. (2008). Type 1 Diabetes Mellitus in Pediatrics. *Pediatr. Rev.* 29, 374–385.
- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656.
- Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.

- Czaja, M.J., Ding, W.-X., Donohue, T.M., Friedman, S.L., Kim, J.-S., Komatsu, M., Lemasters, J.J., Lemoine, A., Lin, J.D., Ou, J.J., et al. (2013). Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy* 9, 1131–1158.
- Das, J., Vasan, V., and Sil, P.C. (2012). Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 296–308.
- de Murcia, G., Schreiber, V., Molinete, M., Saulier, B., Poch, O., Masson, M., Niedergang, C., and de Murcia, J.M. (1994). Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol. Cell. Biochem.* 138, 15–24.
- Degli Esposti, D., Hamelin, J., Bosselut, N., Saffroy, R., Sebah, M., Pommier, A., Martel, C., Lemoine, A., Martel, C., et al. (2012). Mitochondrial Roles and Cytoprotection in Chronic Liver Injury. *Biochem. Res. Int.* 2012, 1–16.
- Ding, H.-S., Yang, J., Chen, P., Yang, J., Bo, S.-Q., Ding, J.-W., and Yu, Q.-Q. (2013). The HMGB1–TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis. *Gene* 527, 389–393.
- Ditsworth, D., Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2007). Activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J. Biol. Chem.* 282, 17845–17854.
- Doan, H.Q., Bowen, K.A., Jackson, L.A., and Evers, B.M. (2009). Toll-like receptor 4 activation increases Akt phosphorylation in colon cancer cells. *Anticancer Res.* 29, 2473–2478.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.
- Dumitriu, I.E., Baruah, P., Manfredi, A.A., Bianchi, M.E., and Rovere-Querini, P. (2005). HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol.* 26, 381–387.
- Dunai, Z., Bauer, P.I., and Mihalik, R. (2011). Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. *Pathol. Oncol. Res.* 17, 791–800.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.

- El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Pocai, A., Jones, P.L., Roeder, R.G., Cooper, M.E., and Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.* 205, 2409–2417.
- Erlandsson Harris, H., and Andersson, U. (2004). Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur. J. Immunol.* 34, 1503–1512.
- Erridge, C. (2010). Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc. Biol.* 87, 989–999.
- Esrefoglu, M. (2012). Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 18, 5533–5541.
- Eum, K.-H., and Lee, M. (2011). Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 348, 61–68.
- Evankovich, J., Cho, S.W., Zhang, R., Cardinal, J., Dhupar, R., Zhang, L., Klune, J.R., Zlotnicki, J., Billiar, T., and Tsung, A. (2010). High Mobility Group Box 1 Release from Hepatocytes during Ischemia and Reperfusion Injury Is Mediated by Decreased Histone Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* 285, 39888–39897.
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 22, 377–388.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916.
- Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., Ruonala, M.O., Priault, M., Salin, B., and Reichert, A.S. (2012). Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 2297–2310.
- Fujita, H., Fujishima, H., Chida, S., Takahashi, K., Qi, Z., Kanetsuna, Y., Breyer, M.D., Harris, R.C., Yamada, Y., and Takahashi, T. (2009). Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1303–1313.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583–1606.
- Garcia-Compean, D., Jaquez-Quintana, J.O., Gonzalez-Gonzalez, J.A., and Maldonado-Garza, H. (2009). Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J. Gastroenterol.* 15, 280–288.

- Geraldes, P., and King, G.L. (2010). Activation of Protein Kinase C Isoforms and Its Impact on Diabetic Complications. *Circ. Res.* 106, 1319–1331.
- Giardino, I., Edelstein, D., and Brownlee, M. (1996). BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 97, 1422–1428.
- Giles, N.M., Watts, A.B., Giles, G.I., Fry, F.H., Littlechild, J.A., and Jacob, C. (2003). Review Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function. *Chem. Biol.* 10, 677–693.
- Gilmartin, A.B.H., Ural, S.H., and Repke, J.T. (2008). Gestational diabetes mellitus. *Rev. Obstet. Gynecol.* 1, 129–134.
- González-Rodríguez, Á., Mayoral, R., Agra, N., Valdecantos, M.P., Pardo, V., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillón, J., Lo Iacono, O., Corazzari, M., Fimia, G.M., et al. (2014). Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis.* 5, e1179.
- Goodwin, G.H., Sanders, C., and Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* 38, 14–19.
- Goth, L., and Eaton, J.W. (2000). Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 356, 1820–1821.
- Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the Autophagy-Inflammation-Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science* (80-.). 333, 1109–1112.
- Ha, H.C., and Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13978–13982.
- Ha, H.C., and Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13978–13982.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.

- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
- Hildeman, D.A., Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (2003). T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* 111, 575–581.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., and Korsmeyer, S.J. (1991). BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6961–6965.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489–495.
- Hoppe, G., Talcott, K.E., Bhattacharya, S.K., Crabb, J.W., and Sears, J.E. (2006). Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp. Cell Res.* 312, 3526–3538.
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J.X., Nagashima, M., Lundh, E.R., Vijay, S., and Nitecki, D. (1995). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.* 270, 25752–25761.
- Hu, S., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G., and Dixit, V.M. (1998). Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* 273, 29648–29653.
- Huang, H., Nace, G.W., McDonald, K.-A., Tai, S., Klune, J.R., Rosborough, B.R., Ding, Q., Loughran, P., Zhu, X., Beer-Stolz, D., et al. (2014). Hepatocyte-specific high-mobility group box 1 deletion worsens the injury in liver ischemia/reperfusion: a role for intracellular high-mobility group box 1 in cellular protection. *Hepatology* 59, 1984–1997.
- Huttunen, H.J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A.J., and Rauvala, H. (2002). Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphotericin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.* 62, 4805–4811.
- Imlay, J.A., and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302–1309.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H.Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., et al. (2000). High glucose level and free fatty acid

stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49, 1939–1945.

- Ito, I., Fukazawa, J., and Yoshida, M. (2007). Post-translational Methylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Causes Its Cytoplasmic Localization in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 282, 16336–16344.
- Ivanović-Matić, S., Bogojević, D., Martinović, V., Petrović, A., Jovanović-Stojanov, S., Poznanović, G., and Grigorov, I. (2014). Catalase inhibition in diabetic rats potentiates DNA damage and apoptotic cell death setting the stage for cardiomyopathy. *J. Physiol. Biochem.* 70, 947–959.
- Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Tsujimoto Y.(1997). Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy *Nature.* 390, 413-7
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549–554.
- Jung, H.S., and Lee, M.-S. (2010). Role of autophagy in diabetes and mitochondria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 79–83.
- Kam, P.C.A., and Ferch, N.I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55, 1081–1093.
- Kaneto, H., Xu, G., Song, K.-H., Suzuma, K., Bonner-Weir, S., Sharma, A., and Weir, G.C. (2001). Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic β -Cell Function through the Induction of Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 276, 31099–31104.
- Kang, J.H. (2013a). Modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the lipid peroxidation product, acrolein. *BMB Rep.* 46, 555–560.
- Kang, R., Livesey, K.M., Zeh, H.J., Loze, M.T., and Tang, D. (2010). HMGB1: a novel Beclin 1-binding protein active in autophagy. *Autophagy* 6, 1209–1211.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 571–580.
- Kang, R., Zhang, Q., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2013b). HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? *Clin. Cancer Res.* 19, 4046–4057.

- Kang, S.J., Wang, S., Kuida, K., and Yuan, J. (2002). Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* 9, 1115–1125.
- Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 161, 3936–3942.
- Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U., and Cuervo, A.M. (2006). Oxidative Stress and Autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 152–162.
- Kikuchi, K., Kawahara, K.-I., Biswas, K.K., Ito, T., Tancharoen, S., Shiomi, N., Koda, Y., Matsuda, F., Morimoto, Y., Oyama, Y., et al. (2010). HMGB1: A new marker for estimation of the postmortem interval. *Exp. Ther. Med.* 1, 109–111.
- Kim, C.H., Yamada, Y., and Adachi, T. (2013). Expression of Extracellular Superoxide Dismutase Protein in Diabetes. *Arch. Plast. Surg.* 40, 517.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 8, 1348–1358.
- Kim, Y.M., Park, E.J., Kim, J.H., Park, S.W., Kim, H.J., and Chang, K.C. (2016). Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 41, 98–105.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Kitahara, T., Takeishi, Y., Harada, M., Niizeki, T., Suzuki, S., Sasaki, T., Ishino, M., Bilim, O., Nakajima, O., and Kubota, I. (2008). High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice. *Cardiovasc. Res.* 80, 40–46.
- Klein, R. (2006). Diabetic Retinopathy and Nephropathy. In *The Diabetic Kidney*, (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 473–498.
- Komatsu, M., and Ichimura, Y. (2010). Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1374–1378.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Mol. Cell* 17, 525–535.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lall, C.G., Aisen, A.M., Bansal, N., and Sandrasegaran, K. (2008). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am. J. Roentgenol.* 190, 993–1002.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 759–774.
- Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.* 141, 2629–2634.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346–347.
- Leclercq, I.A., Da Silva Morais, A., Schroyen, B., Van Hul, N., and Geerts, A. (2007). Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. *J. Hepatol.* 47, 142–156.
- Lee, J.-S., Li, Q., Lee, J.-Y., Lee, S.-H., Jeong, J.H., Lee, H.-R., Chang, H., Zhou, F.-C., Gao, S.-J., Liang, C., et al. (2009). FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.* 11, 1355–1362.
- Lenaz, G. (2012). Mitochondria and Reactive Oxygen Species. Which Role in Physiology and Pathology? In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 93–136.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226.
- LI, G.-Y., Fan, B., and Zheng, Y.-C. (2010). Calcium Overload Is A Critical Step in Programmed Necrosis of ARPE-19 Cells Induced by High-Concentration H₂O₂. *Biomed. Environ. Sci.* 23, 371–377.

- Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H.E., Czura, C.J., Wang, H., Ulloa, L., et al. (2003). Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol. Med.* 9, 37–45.
- Li, L., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell. Signal.* 25, 50–65.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8, 688–698.
- Liang, X., Romo de Vivar Chavez, A., Schapiro, N.E., Loughran, P., Thorne, S.H., Amoscato, A.A., Zeh, H.J., Beer-Stolz, D., Lotze, M.T., and de Vera, M.E. (2009). Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth. *J. Leukoc. Biol.* 86, 599–607.
- Lim, K.-H., and Staudt, L.M. (2013). Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a011247–a011247.
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80, 780–787.
- Lobenhofer, E.K., Boorman, G.A., Phillips, K.L., Heinloth, A.N., Malarkey, D.E., Blackshear, P.E., Houle, C., and Hurban, P. (2006). Application of Visualization Tools to the Analysis of Histopathological Data Enhances Biological Insight and Interpretation. *Toxicol. Pathol.* 34, 921–928.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- Loria, P., Lonardo, A., and Anania, F. (2013). Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol. Res.* 43, 51–64.
- Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 331–342.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and RANDall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

- Luchetti, F., Betti, M., Canonico, B., Arcangeletti, M., Ferri, P., Galli, F., and Papa, S. (2009). ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 339–351.
- Luke, C.J., Pak, S.C., Askew, Y.S., Naviglia, T.L., Askew, D.J., Nobar, S.M., Vetica, A.C., Long, O.S., Watkins, S.C., Stolz, D.B., et al. (2007). An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury. *Cell* 130, 1108–1119.
- Maeda, S., and Shin (2010). NF- κ B, JNK, and TLR Signaling Pathways in Hepatocarcinogenesis. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2010, 367694.
- Maiese, K., Morhan, S.D., and Chong, Z.Z. (2007). Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Neurovasc. Res.* 4, 63–71.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007a). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26, 2527–2539.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007b). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.
- Manders, E.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., van Driel, R., and Aten, J.A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 3), 857–862.
- Manna, P., Das, J., Ghosh, J., and Sil, P.C. (2010). Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I κ B β /NF- κ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1465–1484.
- Martel, C. (2012). Non-Alcoholic Steatohepatitis: New Insights from OMICS Studies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 726–735.
- Mason, G.G.F., and Beyette, J. (1998). Proteolysis in Apoptosis: Enzymes and Substrates. pp. 267–290.
- Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., and Mohamed, J. (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 12, 5–18.
- McAnuff, M.A., Omoruyi, F.O., Morrison, E.Y.S.A., and Asemota, H.N. (2005). Changes in some liver enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed

sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) or commercial diosgenin. *West Indian Med. J.* 54, 97–101.

- Mehnert, H. (1980). Diabetes mellitus 1980: Bericht eines Komitees der WHO. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* 105, 1665–1667.
- Meyer, C., Dostou, J.M., Welle, S.L., and Gerich, J.E. (2002). Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 282, E419–E427.
- Michels, J., Kepp, O., Senovilla, L., Lissa, D., Castedo, M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Functions of BCL-X L at the Interface between Cell Death and Metabolism. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 705294.
- Misra, H.P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873.
- Mizushima, N., and Klionsky, D.J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 19–40.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147, 728–741.
- Montilla, P.L., Vargas, J.F., Túnez, I.F., Muñoz de Agueda, M.C., Valdelvira, M.E., and Cabrera, E.S. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 25, 94–100.
- Musumeci, D., Roviello, G.N., and Montesarchio, D. (2014). An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacol. Ther.* 141, 347–357.
- Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Aug, N., Pamplona, R., and Portero-Oton, M. (2009). Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 3071–3109.
- Neuman, M.G. (2001). Apoptosis in Diseases of the Liver. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 38, 109–166.
- Ng, C.F., Schafer, F.Q., Buettner, G.R., and Rodgers, V.G.J. (2007). The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radic. Res.* 41, 1201–1211.
- Noori, S. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System.

- Nowotny, K., Jung, T., Hohn, A., Weber, D., and Grune, T. (2015). Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules* 5, 194–222.
- Ohgoh, M., Shimizu, H., Ogura, H., and Nishizawa, Y. (2002). Astroglial Trophic Support and Neuronal Cell Death. *J. Neurochem.* 75, 925–933.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Ozougwu, J.C., Obimba, K.C., Belonwu, and Unakalamba (2013). *Journal of Physiology and Pathophysiology* The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. 4, 46–57.
- Palumbo, R., Galvez, B.G., Pusterla, T., De Marchis, F., Cossu, G., Marcu, K.B., and Bianchi, M.E. (2007). Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J. Cell Biol.* 179, 33–40.
- Paneni, F., Beckman, J.A., Creager, M.A., and Cosentino, F. (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur. Heart J.* 34, 2436–2443.
- Park, J.S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Sohn, J.-W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., et al. (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C917-24.
- Park, K.S., Kim, J.H., Kim, M.S., Kim, J.M., Kim, S.K., Choi, J.Y., Chung, M.H., Han, B., Kim, S.Y., and Lee, H.K. (2001). Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 50, 2837–2841.
- Patel, H., Chen, J., Das, K.C., and Kavdia, M. (2013). Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc. Diabetol.* 12, 142.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Pick, E., and Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161–170.
- Pugazhenthii, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E., and Reusch, J.E. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression

through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 10761–10766.

- Radogna, F., Diederich, M., and Ghibelli, L. (2010). Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1844–1852.
- Rajeswari, M.R., and Jain, A. (2002). High-mobility-group chromosomal proteins, HMGA1 as potential tumour markers. *Curr. Sci.* 82.
- Rami, A. (2003). Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol. Dis.* 13, 75–88.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1999). Tripeptidyl-peptidase I is apparently the CLN2 protein absent in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1429, 496–500.
- Read, C.M., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Driscoll, P.C., and Norman, D.G. (1993). Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.* 21, 3427–3436.
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., and Simonsen, A. (2012). Autophagy: More Than a Nonselective Pathway. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 1–18.
- Robertson, R.P., and Harmon, J.S. (2007). Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett.* 581, 3743–3748.
- Rock, K.L., and Kono, H. (2008). The Inflammatory Response to Cell Death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 99–126.
- Rosenfeldt, M.T., and Ryan, K.M. (2011). The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 32, 955–963.
- Rosin, D.L., and Okusa, M.D. (2011). Dangers Within: DAMP Responses to Damage and Cell Death in Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 416–425.
- Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., and Choi, A.M.K. (2007). Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 49–89.
- Sabapathy, K., Kallunki, T., David, J.-P., Graef, I., Karin, M., and Wagner, E.F. (2001). c-Jun NH₂-Terminal Kinase (JNK)1 and JNK2 Have Similar and Stage-dependent Roles in Regulating T Cell Apoptosis and Proliferation. *J. Exp. Med.* 23171200, 317–328.
- Sadi, G., Pektas, M.B., Koca, H.B., Tosun, M., and Koca, T. (2015). Resveratrol improves hepatic insulin signaling and reduces the inflammatory response in streptozotocin-induced diabetes. *Gene* 570, 213–220.

- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. Vande, Gorp, M. van, Loo, G. van, and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874.
- Saikumar, P., Dong, Z., Weinberg, J.M., and Venkatachalam, M.A. (1999). Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17, 3341–3349.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195.
- Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Res.* 64, 7183–7190.
- Shen, M., Lu, J., Dai, W., Wang, F., Xu, L., Chen, K., He, L., Cheng, P., Zhang, Y., Wang, C., et al. (2013). Ethyl pyruvate ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting intrinsic pathway of apoptosis and autophagy. *Mediators Inflamm.* 2013, 461536.
- Shen, S., Kepp, O., and Kroemer, G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8, 1–3.
- Siddiqui, M.A., Mukherjee, S., Manivannan, P., and Malathi, K. (2015). RNase L Cleavage Products Promote Switch from Autophagy to Apoptosis by Caspase-Mediated Cleavage of Beclin-1. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 17611–17636.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Singhal, N.K., Srivastava, G., Patel, D.K., Jain, S.K., and Singh, M.P. (2010). Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. *J. Pineal Res.* 50, no-no.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27, S137–S148.
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., and Sgarbi, G. (2010). Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797, 1171–1177.
- Sparvero, L.J., Asafu-Adjei, D., Kang, R., Tang, D., Amin, N., Im, J., Rutledge, R., Lin, B., Amoscato, A.A., Zeh, H.J., et al. (2009). RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *J. Transl. Med.* 7, 17.

- Steer, S.A., Scarim, A.L., Chambers, K.T., Corbett, J.A., and Corbett, J. (2005). Interleukin-1 Stimulates β -Cell Necrosis and Release of the Immunological Adjuvant HMGB1. *PLoS Med.* 3, e17.
- Stolz, A., Ernst, A., and Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 16, 495–501.
- Stros, M. (2010). HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1799, 101–113.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., et al. (2012). Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell* 148, 213–227.
- Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep.* 3, 604–609.
- Tang, D., Kang, R., Cheh, C.-W., Livesey, K.M., Liang, X., Schapiro, N.E., Benschop, R., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Tracey, K.J., et al. (2010b). HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* 29, 5299–5310.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K., Kroemer, G., Billiar, T., VanHouten, B., Zeh, H., and Lotze, M. (2011a). High-Mobility Group Box 1 Is Essential for Mitochondrial Quality Control. *Cell Metab.* 13, 701–711.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Cheh, C.-W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M.E., Tracey, K.J., Zeh, H.J., et al. (2010a). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* 190, 881–892.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Lotze, M.T. (2011b). High mobility group box 1 (HMGB1) activates an autophagic response to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2185–2195.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456–1462.
- Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A.E., and Thorburn, A. (2009). Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* 16, 175–183.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.

- Uskoković, A., Dinić, S., Mihailović, M., Grdović, N., Arambašić, J., Vidaković, M., Bogojević, D., Ivanović-Matić, S., Martinović, V., Petrović, M., et al. (2012). STAT3/NF- κ B interactions determine the level of haptoglobin expression in male rats exposed to dietary restriction and/or acute phase stimuli. *Mol. Biol. Rep.* 39, 167–176.
- Vande Walle, L., Kanneganti, T.-D., and Lamkanfi, M. (2011). HMGB1 release by inflammasomes. *Virulence* 2, 162–165.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D. V, Festjens, N., and Vandenabeele, P. (2008). Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 8, 207–220.
- Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., et al. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* 209, 1519–1528.
- Wang, D., Li, F., Chi, Y., and Xiang, J. (2012). Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress Chaperones* 17, 423–433.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., et al. (1999). HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* 80, . 285.
- Wang, K., and Lin, B. (2013). Pathophysiological Significance of Hepatic Apoptosis. *ISRN Hepatol.* 2013, 1–14.
- Wang, X., Sun, Y., Yang, H., Lu, Y., and Li, L. (2016). Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes by Modulating the TLR4/NF- κ B Pathway. *Sci. Rep.* 6, 27866.
- Wang, Y., Li, X., Wang, L., Ding, P., Zhang, Y., Han, W., and Ma, D. (2004). An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *J. Cell Sci.* 117, 1525–1532.
- Wei, Y., Chen, P., de Bruyn, M., Zhang, W., Bremer, E., and Helfrich, W. (2010). Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol.* 10, 42.
- Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D., and Thomas, J.O. (1993). Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.* 12, 1311–1319.

- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 1, e18.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., and Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol.* 161, 2524–2532.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109.
- Xu, K., Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001). Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31, 957–971.
- Yagmur, E., Tacke, F., Weiss, C., Lahme, B., Manns, M.P., Kiefer, P., Trautwein, C., and Gressner, A.M. (2006). Elevation of N-(carboxymethyl)lysine-modified advanced glycation end products in chronic liver disease is an indicator of liver cirrhosis. *Clin. Biochem.* 39, 39–45.
- Yakes, F.M., and Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 514–519.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8469–8478.
- Yamashima, T. (2000). Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog. Neurobiol.* 62, 273–295.
- Yan, H., and Harding, J.J. (1999). Inactivation and loss of antigenicity of esterase by sugars and a steroid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1454, 183–190.
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H.S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., et al. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11942–11947.
- Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H.E., Susarla, S.M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., et al. (2004). Reversing established sepsis with

- antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 296–301.
- Yang, L., Xie, M., Yang, M., Yu, Y., Zhu, S., Hou, W., Kang, R., Lotze, M.T., Billiar, T.R., Wang, H., et al. (2014). PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nat. Commun.* 5, 4436.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2009). An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 1–32.
- Yasui, H., and Sakurai, H. (2003). Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. *Exp. Dermatol.* 12, 655–661.
- Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M.A., and Choi, S. (2014). Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front. Immunol.* 5, 334.
- Youn, J.H., and Shin, J.-S. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J. Immunol.* 177, 7889–7897.
- Zhang, S., Zhong, J., Yang, P., Gong, F., and Wang, C.-Y. (2009). HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3, 24–38.
- Zhang, X., Jiang, D., Jiang, W., Zhao, M., and Gan, J. (2015). Role of TLR4-Mediated PI3K/AKT/GSK-3 β Signaling Pathway in Apoptosis of Rat Hepatocytes. *Biomed Res. Int.* 2015, 631326.
- Zhou, F., Yang, Y., and Xing, D. (2011). Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.* 278, 403–413.
- Zhu, Z., and Fang, Z. (2016). Statin protects endothelial cell against ischemia reperfusion injury through HMGB1/TLR4 pathway. *Int. J. Cardiol.* 203, 74.
- Ziegler, U., and Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* 19, 124–128.
- Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20, 1–15.

Biografija

Anja Petrović je rođena 20.09.1985. god. u Beogradu. Osnovnu školu i XII beogradsku gimnaziju je završila u Beogradu. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2004. god. Diplomski rad pod naslovom „Ekspresivnost HMGB1 proteina u serumu i jetri pacova tokom eksperimentalno izazvanog dijabetesa” urađen na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, pod rukovodstvom dr Ilijane Grigorov odbranila je 2011. god. sa ocenom 10, čime je završila osnovne studije sa prosečnom ocenom 8,61 i stekla zvanje Diplomirani molekularni biolog i fiziolog. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija eukariota. Od 2012. god. zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2013. god kao istraživač saradnik na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu“, potprojekat „Ekspresija i signalne uloge proteina HMGB1 u dijabetičnoj jetri” (br. 173020) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Do danas je objavila 5 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 4 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ања Петровић _____

Број индекса _____ М3015/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога HMGB1 протеина у модификацији и интеграцији сигналних путева апоптозе и аутофагије у ћелијама јетре пацова са индукованим дијабетесом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

_____ *A. Petrović* _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Ања Петровић _____

Број индекса _____ М3015/2011 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада Улога НМGB1 протеина у модификацији и интеграцији
сигналних путева апоптозе и аутофагије у ћелијама јетре
пацова са индукованим дијабетесом

Ментор _____ др Илијана Григоров и др Гордана Матић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

A. Petrović _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Улога HMGB1 протеина у модификацији и интеграцији сигналних путева апоптозе и аутофагије у ћелијама јетре пацова са индукованим дијабетесом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

A. Petrović

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.