



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Branka (Srbislav) Đorđević

**EFEKAT MELATONINA NA
PARAMETRE OKSIDATIVNOG
OŠTEĆENJA, INFLAMACIJE I
NEOANGIOGENEZE U RETINI PACOVA
SA DIJABETESOM MELITUSOM TIP 2
IZAZVANIM STREPTOZOTOCIN-
NIKOTINAMIDOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Branka (Srbislav) Đorđević

**THE EFFECT OF MELATONIN ON
PARAMETERS OF OXIDATIVE
DAMAGE, INFLAMMATION AND
NEOANGIOGENESIS IN THE RETINA
OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN/
NICOTINAMIDE INDUCED TYPE 2
DIABETES MELLITUS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Dušan Sokolović, vanredni profesor za užu naučnu oblast Biohemija, Katedra za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
Naslov:	Efekat melatonina na parametre oksidativnog oštećenja, inflamacije i neoangiogeneze u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom
Rezime:	<p>Dijabetesna retinopatija je najčešći uzrok slepila u populaciji starosti od 20 do 79 godina. U osnovi bolesti je metabolička disfunkcija izazvana hiperglikemijom, koja dovodi do oksidativnog oštećenja biomolekula i inflamacije u retini. Oksidativni stres i inflamacija posreduju u oštećenju krvno-retinalne barijere, poremećaju protoka krvi i nastanku ishemije u retini, pri čemu je najznačajniji faktor progresije bolesti vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). Melatonin je hormon koji se sintetiše u pinealnoj žlezdi i retini. Smatra se regulatorom cirkadijarnog ritma, ali pored toga ostvaruje značajne antioksidativne i antiinflamatorne efekte, a zbog svojih fizio-hemijskih osobina se lako transportuje kroz krvno-retinalnu barijeru. Cilj ovog istraživanja je ispitivanje efekata suplementacije melatoninom na parametre metabolizma glukoze i lipida u serumu, kao i parametre oksidativnog oštećenja, inflamacije i neoangiogeneze u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom.</p> <p>Kod eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, pored hiperglikemije i dislipidemije, utvrđena je snižena koncentracija melatonina u serumu. Oralna suplementacija melatoninom u dozi od 0,2 mg/kg telesne mase dovela je do značajnog povišenja koncentracije melatonina u serumu. Životinje tretirane melatoninom su imale niže koncentracije faktora nekroze tumora-α (TNF-α) u serumu, što je od značaja zbog uticaja ovog proinflamatornog citokina na propustljivost krvno-retinalne barijere i proces leukostaze. Melatonin je doveo do sniženja</p>

koncentracija markera oksidativnog oštećenja, i to pokazatelja lipidne peroksidacije (tiobarbiturat reagujuće supstance, TBARS) i oksidativne modifikacije proteina (proizvodi uznapredovale oksidacije proteina, AOPP) u retini, kao i do sniženja koncentracije enzima inducibilna azot-monoksid sintaza (iNOS), koje doprinosi smanjenju oksidativnog oštećenja posredovanim reaktivnim vrstama azota. Melatonin, dodatno, dovodi do sniženja koncentracije VEGF-a i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u retini, što je od značaja za sprečavanje oštećenja krvno-retinalne barijere i procesa neoangiogeneze. Upotreba melatonina se, prema tome, može razmotriti u cilju prevencije ili terapije promena u retini, udruženih sa tipom 2 dijabetesa melitusa.

Naučna oblast:	Medicinske nauke
Naučna disciplina:	Biohemija
Ključne reči:	melatonin, dijabetesna retinopatija, dijabetes melitus tip 2, retina, oksidativni stres, VEGF, MMP-9, sICAM-1, iNOS, TNF- α
UDK:	577 + 612.018 :: [616.379 – 008.64 : 617.735 (043.3)]
CERIF klasifikacija:	B480, B620, B740, P004
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Professor Dušan Sokolović, MD, PhD, associate professor, scientific discipline Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Niš

Title:

The Effect of Melatonin on Parameters of Oxidative Damage, Inflammation and Neoangiogenesis in the Retina of Rats with Streptozotocin/Nicotinamide induced Type 2 Diabetes Mellitus

Abstract:

Diabetic retinopathy is the commonest cause of blindness in the population aged 20 to 79 years. The molecular basis of the disease is metabolic dysfunction caused by hyperglycemia, which leads to oxidative damage of biomolecules and inflammation in the retina. Oxidative stress and inflammation cause damage to the blood-retinal barrier, impaired blood flow and ischemia in the retina, while vascular endothelial growth factor (VEGF) is considered to be the most important factor of disease progression. Melatonin is a hormone that is synthesized in the pineal gland and retina. It is considered a circadian rhythm regulator, but it also exerts significant antioxidant and anti-inflammatory effects and is easily transported through the blood-retinal barrier due to its physiochemical properties. The aim of this study is to determine the effects of melatonin supplementation on the parameters of serum glucose and lipid metabolism, as well as on the parameters of oxidative damage, inflammation, and neoangiogenesis in retina of rats with streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. Besides from hyperglycemia and dyslipidemia, a reduced serum melatonin concentration was found in experimental animals with type 2 diabetes mellitus. Oral supplementation with melatonin at a dose of 0.2 mg/kg of body weight led to a significant increase in serum melatonin concentration. Animals treated with melatonin had reduced serum tumor necrosis factor α (TNF- α) levels, which is important due to the impact of this proinflammatory cytokine on the blood-retinal barrier permeability and the leukostasis. Melatonin reduced the concentration of oxidative damage markers, in

particular the lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) and protein oxidation (advanced oxidation protein products, AOPP) markers in the retina, as well as, the concentration of an enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS), which contributes to the oxidative damage through the production of reactive nitrogen species. Melatonin, in addition, leads to a decrease in the retinal concentration of VEGF and the matrix of metalloproteinase 9 (MMP-9), which prevents the damage to the blood-retinal barrier and the neoangiogenesis. The use of melatonin can, therefore, be considered in the prevention or in the therapy of changes in the retina associated with type 2 diabetes mellitus.

Scientific Field: Medical sciences

Scientific Discipline: Biochemistry

Key Words: melatonin, diabetic retinopathy, type 2 diabetes mellitus, retina, oxidative stress, VEGF, MMP-9, sICAM-1, iNOS, TNF- α

UDC: 577 + 612.018 :: [616.379 – 008.64 : 617.735 (043.3)]

CERIF Classification: B480, B620, B740, P004

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemiju i Naučno-istraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, u okviru projekta III43012 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, kojim rukovodi prof. dr Dušan Sokolović.

Najlepše hvala,

mentoru prof. dr Dušanu Sokoloviću, prof. dr Tatjani Cvetković i prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov što ste mi pružili priliku da učim od Vas i na nesebičnoj profesionalnoj i prijateljskoj pomoći i podršci koju ste mi pružili prilikom izrade i oblikovanja ove disertacije,

prof. dr Danijeli Kostić i prof. dr Radivoju Kociću na vremenu uloženom u čitanje ove disertacije i korisnim savetima i sugestijama,

prof. dr Dušici Pavlović, prof. dr Gordani Kocić i prof. dr Ivani Stojanović na idejama ugrađenim u ovu disertaciju, korisnim savetima, velikodušnoj profesionalnoj i prijateljskoj podršci,

docentima Jeleni Bašić, Andreju Veljkoviću, Mileni Despotović i Aleksandri Veličkov na nesebičnoj pomoći u laboratorijskom radu i izradi disertacije, na korisnim savetima, sugestijama, profesionalnoj i prijateljskoj podršci, pozitivnoj energiji i optimizmu koju su uneli u svakodnevnu saradnju,

Slavoljubu Živanoviću i kolegama Nataši, Davoru, Draganu i Mariji na konstruktivnoj saradnji i velikoj pomoći u laboratorijskom i eksperimentalnom radu,

Svetlani Stojanović, laborantima Dragani i Sandri, radnicima vivarijuma Vesni, Vladi i Zvonku na velikoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenta,

svim kolegama i koleginicama iz Naučno-istraživačkog centra za biomedicinu što čine ovo mesto prijatnim za rad,

Suzi i Slavici, jer kuvaju odličan kakao,

tata Srbi, mama Miri, sestri Mileni, baba Ljilji, suprugu Milošu i sinu Mateji bez čije ljubavi, razumevanja, podrške i pomoći nijedan uspeh ne bi bio moguć i ne bi imao smisla.

Hvala na pomoći, na ukazanom poverenju i što ste bili uz mene kad je trebalo, ova disertacija je naš zajednički uspeh!

Sadržaj

1. Uvod.....	14
1.1. Retina – neurovaskularna jedinica i krvno-retinalna barijera.....	16
1.2. Dijabetesna retinopatija.....	18
1.2.1. Socio-ekonomski značaj dijabetesne retinopatije i faktori rizika za njen nastanak.....	18
1.2.2. Klinička slika i klasifikacija dijabetesne retinopatije.....	20
1.3. Patogeneza dijabetesne retinopatije.....	23
1.3.1. Strukturne i funkcionalne promene neurovaskularne jedinice i krvno-retinalne barijere u dijabetesnoj retinopatiji.....	23
1.3.2. Molekularni mehanizmi uključeni u patogenezu dijabetesne retinopatije...25	
1.3.2.1. Biohemijski poremećaji uzrokovani hiperglikemijom u dijabetesnoj retinopatiji.....	25
1.3.2.2. Oksidativni stres u dijabetesnoj retinopatiji.....	28
1.3.2.3. Inflamacija i neoangiogeneza u dijabetesnoj retinopatiji.....	31
1.3.2.4. Ćelijska smrt u dijabetesnoj retinopatiji.....	33
1.3. Profilaksa i terapija dijabetesne retinopatije.....	35
1.4. Melatonin.....	36
1.4.1. Biosinteza melatonina.....	36
1.4.2. Regulacija biosinteze melatonina.....	37
1.4.3. Katabolizam melatonina.....	38
1.4.4. Melatoninski receptori.....	39
1.4.5. Antioksidativni i antiinflamatorni efekti melatonina.....	41
2. Hipoteza i cilj istraživanja.....	46
3. Materijal i metode.....	48
3.1. Hemijske supstance.....	48
3.1.1. Streptozotocin.....	48
3.1.2. Nikotinamid.....	49
3.1.3. Melatonin.....	50
3.1.4. Metformin.....	50
3.2. Eksperimentalne životinje.....	51
3.3. Etički principi u radu sa eksperimentalnim životinjama.....	53

3.4. Eksperimentalni model i eksperimentalne grupe.....	53
3.4.1. Animalni model dijabetesa melitusa tip 2.....	53
3.4.2. Tretman melatoninom i metforminom.....	54
3.4.3. Pregled grupa eksperimentalnih životinja.....	55
3.5. Eksperimentalni protokol.....	56
3.6. Priprema uzoraka.....	56
3.7. Metode.....	57
3.7.1. Određivanje koncentracije glukoze u serumu.....	57
3.7.2. Određivanje koncentracije fruktozamina u serumu.....	58
3.7.3. Određivanje koncentracije insulina u serumu.....	58
3.7.4. Određivanje kvantitativnog indeksa insulinske senzitivnosti.....	59
3.7.5. Određivanje koncentracije triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola u serumu eksperimentalnih životinja.....	59
3.7.6. Određivanje koncentracije faktora nekroze tumora- α u serumu.....	59
3.7.7. Određivanje koncentracije melatonina u serumu.....	60
3.7.8. Određivanje koncentracije tiobarbiturat reagujućih supstanci u homogenatu retine.....	61
3.7.9. Određivanje koncentracije proizvoda uznapredovale oksidacije proteina u homogenatu retine.....	62
3.7.10. Određivanje koncentracije inducibilne azot-monoksid sintaze u homogenatu retine.....	62
3.7.11. Određivanje koncentracije vaskularnog endotelnog faktora rasta u homogenatu retine.....	63
3.7.12. Određivanje koncentracije solubilnog intercelularnog adhezionog molekula 1 u homogenatu retine.....	64
3.7.13. Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze 9 u homogenatu retine.....	64
3.7.14. Određivanje koncentracije kaspaze-3 u homogenatu retine.....	65
3.7.15. Određivanje koncentracije proteina u homogenatu retine.....	66
3.8. Statistička obrada podataka.....	66
4. Rezultati.....	67
4.1. Telesna masa, unos hrane i vode eksperimentalnih životinja.....	67
4.2. Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih životinja.....	68
4.3. Koncentracija fruktozamina u serumu eksperimentalnih životinja.....	70

4.4. Koncentracija insulina u serumu eksperimentalnih životinja.....	71
4.5. Vrednosti kvantitativnog indeksa provere insulinske senzitivnosti kod eksperimentalnih životinja.....	72
4.6. Koncentracija triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola u serumu eksperimentalnih životinja.....	73
4.7. Koncentracija melatonina u serumu eksperimentalnih životinja.....	74
4.8. Koncentracija faktora nekroze tumora- α u serumu eksperimentalnih životinja..	75
4.9. Koncentracija tiobarbiturat reagujućih supstanci u homogenatu retine.....	76
4.10. Koncentracija proizvoda uznapredovale oksidacije proteina u homogenatu retine.....	77
4.11. Koncentracija inducibilne azot-monoksid sintaze u homogenatu retine.....	78
4.12. Koncentracija vaskularnog endotelnog faktora rasta u homogenatu retine.....	79
4.13. Koncentracija solubilnog intercelularnog adhezionog molekula 1 u homogenatu retine.....	80
4.14. Koncentracija matriks metaloproteinaze 9 u homogenatu retine.....	81
4.15. Efekat melatonina na koncentraciju kaspaze-3 u homogenatu retine.....	82
4.16. Korelacija koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijama parametara metabolizma glukoze i serumskih lipida.....	83
4.17. Korelacija koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijama parametara oksidativnog oštećenja u retini.....	85
4.18. Korelacija koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijom citokina, adhezivnih molekula i enzima uključenih u inflamaciju, neovaskularizaciju i apoptozu u retini.....	87
5. Diskusija.....	89
5.1. Analiza efekata primene melatonina na telesnu masu eksperimentalnih životinja.....	89
5.2. Analiza efekata primene melatonina na koncentracije parametara metabolizma glukoze i lipida u serumu eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2.....	90
5.3. Analiza koncentracije melatonina u serumu eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2.....	98
5.4. Analiza efekata primene melatonina na koncentracije pokazatelja oksidativnog oštećenja u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2.....	100

5.5. Analiza efekata primene melatonina na koncentraciju medijatora inflamacije u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2.....	102
5.6. Analiza efekata primene melatonina na medijatore oštećenja krvno-retinalne barijere i neoangiogeneze u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2.....	106
5.7. Analiza efekata melatonina na koncentraciju kaspaze-3 u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2.....	110
6. Zaključak.....	112
7. Literatura.....	113
Biografija kandidata.....	154

Spisak korišćenih skraćenica

- 8-OhdG – 8-hidroksi-2' -deoksiguanozin
- AANAT – aralkilamin N-acetiltransferaza
- AFMK – N-acetil-N-formil-5-metoksikinuramin
- AMK – N-acetil-5-metoksikinuramin
- AMPK – AMP-om aktivirana protein kinaza
- AOPP (engl. advanced oxidation protein products) – proizvodi uznapredovale oksidacije proteina
- ARE (engl. antioxidant responsive element) – element antioksidativnog odgovora
- ASMT – acetil serotonin metil transferaza
- ATP – adenzin trifosfat
- c3OHM – ciklični 3-hidroksimelatonin
- cAMP – ciklični adenzin monofosfat
- CYP – citohrom
- DAG – diacil glicerol
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
- ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) – enzimski imunoesej
- FAS – fas ligand (TNF superfamilija, član 6)
- GSH – glutation
- HDL (engl. High-density lipoprotein) – lipoprotein velike gustine
- HIF1 (engl. Hypoxia-inducible factor 1) – hipoksija inducibilni faktor 1
- HIOMT – hidroksiindol-O-metiltransferaza
- HPLC (engl. high-performance liquid chromatography) – tečna hromatografija visokih performansi
- HRP (engl. horseradish peroxidase) – peroksidaza rena
- IL-1 β – interleukin 1 β
- IL-6 – interleukin 6
- IL-8 – interleukin 8
- iNOS – inducibilna azot-monoksid sintaza
- IP3 – inozitol trifosfat
- JNK – c-Jun N-terminalna kinaza
- LDL(engl. low-density lipoprotein) – lipoprotein male gustine
- LXR(engl. Liver X Receptors) – jetrini X receptori

MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) – mitogenom aktivirana protein kinaza

MDA – malondialdehid

MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9

mRNK – mitohondrijalna ribonukleinska kiselina

MT1 (ili MTNR1A) – melatoniniski receptor 1

MT2 (ili MTNR1B) – melatoniniski receptor 2

mTOR (engl. mammalian target of rapamycin) – protein kinaza mTOR

NA – nikotinamid

NAD⁺/H – oksidovani/redukovani nikotinamid adenin dinukleotid

NADP⁺/H – oksidovani/redukovani nikotinamid dinukleotid fosfat

NF- κ B (engl. nuclear factor - kappa-B) – nuklearni faktor kapa B

NLRP3 (engl. nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing 3;NLR Family Pyrin Domain Containing 3) – NLRP3

inflamazom

NO – azot-monoksid

Nrf2 (engl. nuclear erythroid 2-related factor 2) – faktor Nrf2

PARP-1 – poli ADP-riboza polimeraza 1

PVN (engl. paraventricular nucleus) – paraventrikularno jedro

QUICKI (engl. quantitative insulin sensitivity check index) – kvantitativni indeks
provere insulinske senzitivnosti

RNK – ribonukleinska kiselina

RVA – reaktivne vrste azota (engl Reactive Nitrogen Spaces, RNS)

ROR/RZR – RAR-srodni nuklearni orfan receptori

RVK – reaktivne vrste kiseonika (engl Reactive Oxygen Spaces, ROS)

SCN (engl. suprachiasmatic nucleus) – suprahijzmatzsko jedro

sICAM-1 (engl. soluble intercellular adhesion molecule-1) – solubilni intracelularni
adhezioni molekul 1

Sirt1 – sirtuin 1, NAD⁺-zavisna deacetilaza

STZ – streptozotocin

TBARS (engl. thiobarbituric acid reactive substances) – tiobarbiturat reagujuće
supstance

TMB – tetrametilbenzidin

TNF- α (engl. tumor necrosis factor α) – faktor nekroze tumora- α

TNFR – receptor za TNF

TRAIL (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) – TNF srodni apoptoza-indukujući ligand

TUNEL (engl. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling)
– TUNEL esej, metod za detektovanje apoptoze

VCAM-1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1) – vaskularni ćelijski adhezioni molekul

VEGF (engl. vascular endothelial growth factor) – vaskularni entotelni faktor rasta

VEGFR – receptor za VEGF

1. Uvod

Dijabetesna retinopatija je neurovaskularna komplikacija dijabetesa melitusa tip 1 i 2 i najčešći uzrok slepila u radno aktivnoj populaciji (Solomon i sar., 2017). Značajnim za patogenezu ove komplikacije dijabetesa melitusa smatraju se metabolička disfunkcija izazvana hiperglikemijom, oksidativni stres, inflamacija i apoptoza u retini (Tarr i sar., 2013). Narušavanje integriteta krvno-retinalne barijere, kao i građe i funkcije neurovaskularne jedinice, koji se javljaju kao posledica hiperglikemije, oksidativnog oštećenja i inflamacije, za posledicu imaju oštećenje i/ili gubitak vida. Najznačajnijim medijatorima oštećenja krvno-retinalne barijere i progresije dijabetesne retinopatije se pri tom smatraju faktor nekroze tumora α (TNF- α) i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) (Tarr i sar., 2013). Aktuelna istraživanja u oblasti terapije dijabetesne retinopatije ukazala su na potencijal stimulacije Nrf2/ARE signalnog puta (engl. Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2/Antioxidant Responsive Element) i njegov značaj u prevenciji oštećenja retine i gubitka vida izazvanih dijabetesom (Deliyanti i sar., 2018).

Melatonin je neurohormon pinealne žlezde koji se dominantno izlučuje u odsustvu svetlosti i predstavlja glavni regulator cirkadijarnog ritma kičmenjaka. Ovaj hormon je široko rasprostranjen u živom svetu, od jednoćelijskih organizama do sisara. Usled naglašene antioksidativne sposobnosti (Kocic i sar., 2017; Reiter i sar., 2016), melatonin predstavlja faktor koji štiti ćelije od zračenja ili na drugi način nastalog ćelijskog oštećenja (Bisquert i sar., 2018; Ničković i sar., 2018; Sokolovic i sar., 2008). Molekul melatonina ima sposobnost da direktno uklanja slobodne radikale i stimuliše aktivnost antioksidativnih enzima Nrf2/ARE mehanizmom, što ga čini značajnim za antioksidativnu zaštitu ćelija (Hristova i sar., 2015; Reiter i sar., 2016, 2003).

Ritmička ekspresija oscilirajućih (engl. clock) gena predstavlja molekularni mehanizam koji, u sklopu regulacije cirkadijarnih ritmova, sinhronizuje metabolizam, fiziološke funkcije i ponašanje jedinke sa 24-časovnim solarnim ciklusom (Iuvone i sar., 2005). Koncentracija melatonina u serumu/plazmi ritmički se menja u toku 24 sata i u toku godine sa pikom u toku noći, odnosno u toku zime. Dnevne i godišnje varijacije u nivou melatonina omogućavaju kičmenjacima da se adaptiraju na ciklične promene u životnoj sredini. U sklopu regulacije cirkadijarnih ritmova, melatonin u organizmu

reguliše brojne procese posredstvom melatoninskih receptora, naročito ciklus spavanje-budnost, sezonsku reprodukciju, energetske metabolizam, imuni odgovor, krvni pritisak i mnoge druge (Reiter i sar., 2014). Fiziološki efekti melatonina se ipak razlikuju kod takozvanih dnevnih i noćnih životinja, jer je kod prvih visoka koncentracija melatonina udružena sa fizičkom aktivnošću, a kod drugih sa odmorom i snom (Pandi-Perumal i sar., 2008)

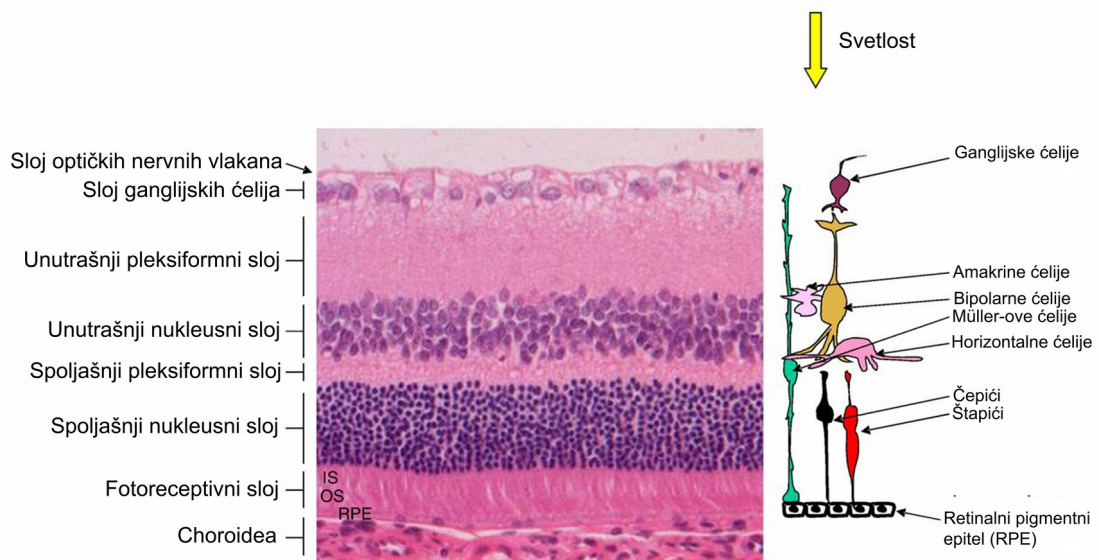
Sve više je dokaza da su cirkadijarni ritmovi usko povezani sa održavanjem metaboličke ravnoteže i da njihov poremećaj može doprineti nastanku kardiovaskularnih bolesti, gojaznosti i dijabetesa (Green i sar., 2008). Održavanje koncentracije glukoze u krvi unutar fizioloških granica je jedan od najznačajnijih homeostatskih procesa u organizmu čoveka. Najznačajniju ulogu u ovom procesu igra endokrini pankreas koji sintetiše hormone uključene u regulaciju metabolizma glukoze. Pored insulina koji ima hipoglikemijski efekat, endokrini pankreas luči i glukagon, somatostatin, pankreasni polipeptid i grelin koji direktno, odnosno indirektno učestvuju u regulaciji koncentracije glukoze u krvi (Gesundo i sar., 2017). Njihova sinteza i sekrecija, podležu regulaciji od strane većeg broja neurohormona (među kojima je i melatonin), aminokiselina, citokina i peptida, poreklom iz mozga ili digestivnog trakta, koji deluju kao modulatori sekrecije endokrinog pankreasa, posredstvom receptora i njihovih signalnih kaskada (Gesundo i sar., 2017). Prisustvo melatoninskih receptora utvrđeno je na membranama α , β i δ ćelija insula pankreasa (Zibolka i sar., 2018), štaviše utvrđeno je da pored efekta na sintezu i oslobađanje insulina, melatonin utiče i na lučenje glukagona i somatostatina (Bähr i sar., 2011; Zibolka i sar., 2015).

Genomske studije su identifikovale udruženost rs10830963 varijante melatoninskih receptora MT2-MTNR1B i predijabetesa odnosno dijabetesa melitusa tip 2 (Sparsø i sar., 2009; Tam i sar., 2010), kao i rs4753426 varijante i gestacionog dijabetesa (Zhan i sar., 2015). Nosioci mutacije rs10830963 imaju smanjeno oslobađanje insulina nakon oralnog ili intravenskog opterećenja glukozom, disfunkciju β ćelija i hepatičnu insulinsku rezistenciju (Sparsø i sar., 2009). Lokus rs10830963 utiče na ekspresiju kvantitativnih svojstava (engl. eQTL-Expression Quantitative Trait Loci) i povećava sintezu mRNK za melatoninski receptor MT2-MTNR1B (Tuomi i sar., 2016), na taj način potencirajući efekat melatonina na sekreciju insulina.

Koncentracija serumskog melatonina u dijabetesu melitusu je najčešće izmenjena (Amaral i sar., 2014; Mäntele i sar., 2012), pri tom su niske vrednosti serumskog melatonina nezavisno udružene sa povećanim rizikom za nastanak dijabetesa melitusa tip 2 kod ljudi (McMullan i sar., 2013). Uzevši u obzir činjenicu da je retina, pored pinealne žlezde, mesto sinteze melatonina, i da je sinteza melatonina u dijabetesu smanjena u retini (do Carmo Buonfiglio i sar., 2011) i pinealnoj žlezdi (Frese i sar., 2009), može se pretpostaviti da ovo sniženje koncentracije melatonina ostvaruje uticaj na biohemijske procese u retini značajne za patogenezu dijabetesne retinopatije.

1.1. Retina – neurovaskularna jedinica i krvno-retinalna barijera

Retina je neurosenzorni deo oka koji iznutra oblaže očnu jabučicu. Građena je od 10 slojeva koji sadrže neurone, fotoreceptore i glijalne ćelije (slika 1).



Slika 1. Histološka građa retine Vistar pacova, hematoksilin-eozin bojenje, x20 (Redfern i sar., 2011).

Neurovaskularnu jedinicu u retini čine neuroni, glijalne ćelije i krvni sudovi povezani u funkcionalnu celinu koja koordiniše metaboličke zahteve, sinaptičku aktivnost, protok krvi i uklanjanje metaboličkog otpada unutar retine (Stem i Gardner, 2013). Neurovaskularna jedinica omogućava autoregulaciju, odnosno prilagođavanje

protoka krvi metaboličkoj aktivnosti ćelija (Gardner i Davila, 2017; Metea i Newman, 2007).

Tkivo retine spada u metabolički najaktivnija tkiva u našem organizmu i usled toga je jako osetljivo na ishemiju (Frank, 2004; Kumari i sar., 2008). Osetljivost retine na smanjenje protoka krvi i ishemiju dodatno povećava specifičnost retinalne vaskularizacije koja se karakteriše dvostrukom nepreklapajućom cirkulacijom i postojanjem terminalnih arterija (Stewart, 2010; Hildebrand i Fielder, 2011). Spoljašnja trećina retine snabdeva se krvlju iz horiokapilara lociranih između retine i sklere (horoidalna cirkulacija). Horoidalna cirkulacija snabdeva krvlju avaskularni sloj fotoreceptora i retinalni pigmentni epitel (Hildebrand i Fielder, 2011). Preostali unutrašnji deo retine snabdeva se krvlju iz grana centralne retinalne arterije koja u retinu ulazi kroz optički disk (retinalna cirkulacija) i daje temporalne i nazalne grane (Stewart, 2010). Gornje i donje temporalne grane centralne retinalne arterije i vene oivičavaju područje retine, bogato fotoreceptorima, koje se označava kao makula (Wu, 2010). Retinalne arterije su terminalne i putuju prema periferiji retine unutar sloja nervnih vlakana. Arteriole koje iz njih nastaju daju dva tipa kapilarnih sistema: horizontalni, koji vaskularizuje sloj nervnih vlakana, i duboki, koji u zavisnosti od debljine retine, formira između 1 i 4 horizontalna kapilarna sistema u unutrašnjosti retine (Hildebrand i Fielder, 2011). Krv se iz retine odvodi sistemom retinalnih venula preko retinalnih vena sve do centralne retinalne vene koja napušta očnu jabučicu kroz optički disk (Stewart, 2010; Hildebrand i Fielder, 2011).

Protok krvi kroz retinu regulisan je na nivou prekapilarne arteriole, sistemskim i lokalnim faktorima (Hildebrand i Fielder, 2011). Sem efekata sistemskih faktora (autonomna inervacija i hormoni – adrenalin, vazopresin, angiotenzin) retina je osetljiva na dejstvo lokalnih faktora kao što su promene hidrostatskog pritiska ili metaboličke promene u samom tkivu (Gardner i Davila, 2017; Hildebrand i Fielder, 2011; Newman, 2015). Horoidalna cirkulacija ima jaku simpatičku regulaciju i neosetljiva je na dejstvo lokalnih fakora. Za razliku od nje, protok krvi kroz retinalnu cirkulaciju je gotovo isključivo kontrolisan lokalnim faktorima (autoregulacija), zbog nedostatka autonomne inervacije (Hildebrand i Fielder, 2011) što je čini posebno osetljivom na metaboličke promene u samom tkivu. Mlečna kiselina, ATP i azot-monoksid, poreklom iz glijalnih

ćelija učestvuju u regulaciji protoka krvi kroz retinalnu cirkulaciju kao i u regulaciji neuronalne aktivnosti (Newman, 2015).

Retina zahteva specifičnu mikrookolinu za svoje normalno funkcionisanje i usled toga je zaštićena krvno-retinalnom barijerom koja ima spoljašnju i unutrašnju komponentu. Spoljašnju krvno-retinalnu barijeru gradi pigmentni epitel retine, dok unutrašnju čini zid krvnih sudova retine, odnosno bazalna lamina i njemu pripadajuće nefenestrirane endotelne ćelije, periciti i glijalne ćelije (neurovaskularna jedinica) (Klaassen i sar., 2013). Ćelije koje učestvuju u izgradnji barijere su međusobno povezane tesnim spojevima i na taj način sprečavaju prenos jona, velikih molekula i ćelija u retinu. Transport kroz krvno-retinalnu barijeru moguć je paracelularnom rutom kroz otvorene tesne spojeve i transcelularnom rutom. Transcelularna ruta podrazumeva transport difuzijom kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane, posredstvom specijalizovanih transportnih vezikula (kaveola) ili receptora (Klaassen i sar., 2013). U fiziološkim uslovima, voda, mali nepolarni i polarni molekuli (O_2 , CO_2) kao i lipofilni molekuli mogu nesmetano da prolaze kroz krvno-retinalnu barijeru (Hildebrand i Fielder, 2011).

1.2. Dijabetesna retinopatija

1.2.1. Socio-ekonomski značaj dijabetesne retinopatije i faktori rizika za njen nastanak

Dijabetes melitus je hronična metabolička bolest koja se karakteriše nedostatkom insulina ili izostankom odgovora na dejstvo insulina na nivou perifernih tkiva. Ova bolest pogađa 451 milion ljudi širom sveta, pri čemu je procenjeno da je kod oko polovine obolelih bolest nedijagnostikovana (Cho i sar., 2018). Očekuje se da broj obolelih od dijabetesa melitusa do 2030. godine poraste za 69% u zemljama u razvoju i za 20% u razvijenim zemljama (Shaw i sar., 2010) i da dostigne ukupan broj od 693 miliona obolelih do 2045. godine.

Najčešći tipovi dijabetesa melitusa su tip 1 i tip 2, dok mali broj obolelih razvija forme kao što su adultni oblik dijabetesa melitusa mladih ili latentni autoimuni dijabetes odraslih (American Diabetes Association, 2017). Tip 1 dijabetesa nastaje kao posledica autoimune destrukcije β -ćelija pankreasa koje proizvode insulin, dok tip 2 najčešće nastaje kao posledica insulinske rezistencije i relativnog deficita insulina (American Diabetes Association, 2017). Od ukupnog broja dijagnostikovanih slučajeva dijabetesa melitusa, preko 90% čine oboleli od dijabetesa tip 2 (Bullard i sar., 2018; G. Xu i sar., 2018).

Dijabetesna retinopatija je neurovaskularna komplikacija dijabetesa melitusa tip 1 i 2 i najčešći je uzrok slepila u populaciji starosti od 20 do 79 godina (Solomon i sar., 2017). Procenjeno je da je u 2010. godini oko 93 miliona ljudi širom sveta kao komplikaciju dijabetesa melitusa razvilo dijabetesnu retinopatiju, dok se kod čak 28 miliona ljudi razvio oblik koji ugrožava vid (Yau i sar., 2012). Ukupna prevalenca dijabetesne retinopatije u celom svetu je 34,6%, dok je prevalenca dijabetesne retinopatije koja ugrožava vid 10,2% (Yau i sar., 2012). U periodu od 1990. do 2010. registrovan je dramatičan porast broja osoba sa slepilom (27%) ili oštećenjem vida (64%) nastalim kao posledica dijabetesne retinopatije, pri čemu je porast bio naročito izražen u regionima sa značajnim starenjem populacije, kao što su Severna Amerika, Australija i Evropa (Leasher i sar., 2016). Dijabetesna retinopatija značajno narušava kvalitet života obolelih (Radhakrishnan i sar., 2018), a imajući u vidu veličinu pogođene populacije, predstavlja veliko socio-ekonomsko opterećenje.

Faktori rizika za nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije su dužina trajanja dijabetesa melitusa, hiperglikemija, hiperlipidemija i nefropatija (ACCORD Study Group and ACCORD Eye Group i sar., 2010; Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group i sar., 2015; Klein i sar., 1984; Matthews i sar., 2004; Solomon i sar., 2017). Ipak, najznačajnijim faktorima koji doprinose nastanku i progresiji dijabetesne retinopatije se smatraju dužina trajanja dijabetesa melitusa i hiperglikemija (Solomon i sar., 2017). Značaj hiperglikemije za nastanak i razvoj dijabetesne retinopatije, naglašen je činjenicom da za svaki procenat sniženja glikozilisanog hemoglobina, rizik za nastanak dijabetesne retinopatije pada za 35% (American Diabetes Association, 2003).

1.2.2. Klinička slika i klasifikacija dijabetesne retinopatije

Dijabetesna retinopatija je neurovaskularna komplikacija dijabetesa melitusa koja se razvija postepeno i bez simptoma, ali vremenom dovodi do oštećenja i gubitka vida. Kada se oštećenje vida javi može biti u formi plutajućih mrlja, zamućenja vida, iskrivljene slike, oslabljenog vida u mraku ili progresivnog gubitka oštine vida.

Dijabetesna retinopatija u toku svoje progresije prolazi kroz neproliferativni i proliferativni stadijum (tabela 1). Oštećenje vida može da nastane u sklopu neproliferativnog ili proliferativnog stadijuma i najčešće se javlja kao posledica makularnog edema, krvarenja u staklastom telu ili ablacije retine (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017; Stewart, 2010; Wu, 2010).

Tabela 1. Internacionalna klinička klasifikacija dijabetesne retinopatije (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017)

Internacionalna klinička klasifikacija dijabetesne retinopatije	
Blaga neproliferativna dijabetesna retinopatija	<ul style="list-style-type: none">• prisustvo mikroaneurizmi
Umereno teška neproliferativna dijabetesna retinopatija	<ul style="list-style-type: none">• mikroaneurizme i drugi znaci retinopatije, ali bez zadovoljavanja kriterijuma za tešku neproliferativnu retinopatiju
Teška neproliferativna dijabetesna retinopatija	<ul style="list-style-type: none">• intraretinalne hemoragije (≥ 20 u svakom kvadrantu)• vensko krvarenje (u 2 kvadranta)• intraretinalne mikrovaskularne abnormalnosti (u 1 kvadrantu)
Proliferativna dijabetesna retinopatija	<ul style="list-style-type: none">• neovaskularizacija• preretinalne hemoragije/krvarenja u staklastom telu

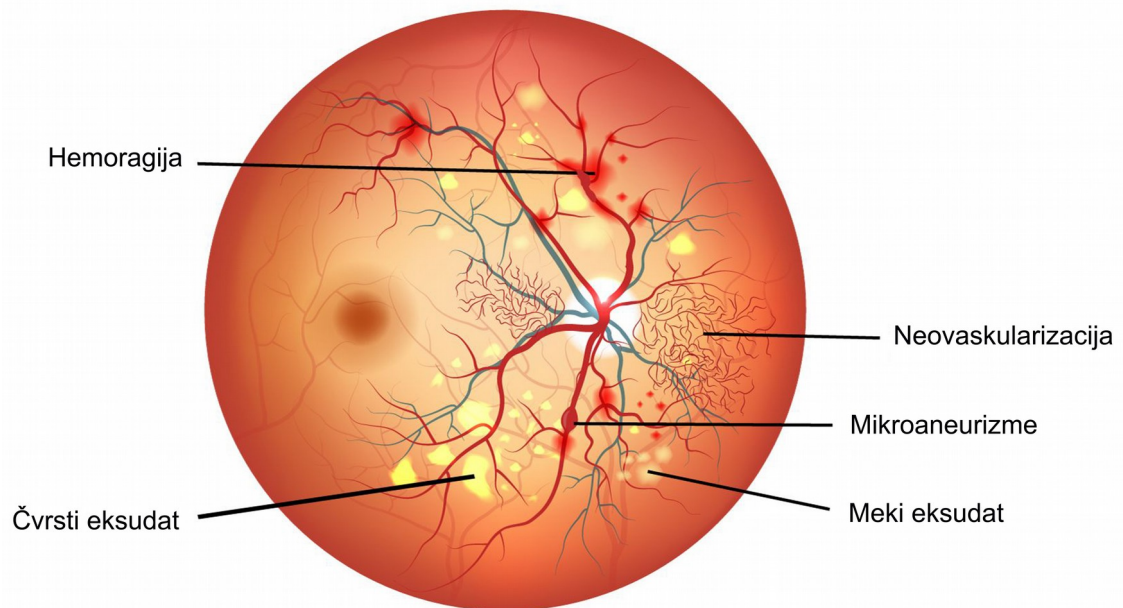
Neproliferativna dijabetesna retinopatija predstavlja početni stadijum bolesti i prisutna je kod većine dijabetičara, bez kliničkih simptoma oštećenja vida. Oštećenja malih krvnih sudova udružena sa slabošću kapilarnog zida dovode do pojave mikroaneurizmi (slika 2), koje su ujedno prva klinički uočljiva lezija karakteristična za dijabetesnu retinopatiju. Rupture zida krvnog suda i sa njima povezana krvarenja su

česte na mestima gde su prisutne mikroaneurizme (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017). Ova krvarenja se prezentuju kao tačke ili mrlje u retini (engl. dot-and-blot). „Dot-and-blot“ hemoragije nalaze se u unutrašnjem nuklearnom sloju retine, ali se mogu širiti i u spoljašnji pleksiformni sloj. Plamičaste (engl. flame-shaped) hemoragije su krvarenja koja nastaju u površnijem sloju nervnih vlakana u retini. Masivne hemoragije mogu da konfluiraju i da zahvate sve slojeve retine, čak i da se šire u subretinalni prostor i staklasto telo (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017; Wu, 2010).

Narušena kapilarna funkcija manifestuje se i povećanom propustljivošću krvno-retinalne barijere, što izaziva izlazak tečnosti iz krvnih sudova, retinalni ili makularni edem i nakupljanje čvrstog eksudata (slika 2). Makularni edem predstavlja nakupljanje tečnosti u spoljašnjem pleksiformnom sloju retine, ispod makule, što dovodi do narušavanja njene funkcije i oštećenja centralnog vida (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017). Makularni edem je ujedno i najčešći razlog oštećenja vida u dijabetesnoj retinopatiji. Nakon resorpcije tečnosti, u retini zaostaju depoziti lipida i proteina koji podsećaju na vosak i nazivaju se čvrsti eksudat (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017; Wu, 2010). Postojanje čvrstog eksudata može da dovede do mikrocistične degeneracije usled fizičkog pritiska na neurone u retini (Wu, 2010).

Sa daljim napredovanjem dijabetesne retinopatije javljaju se promene u morfologiji krvnih sudova kao što su venska dilatacija i venske brojanice (engl. venous beading), intraretinalne vaskularne abnormalnosti kao i opstrukcije malih krvnih sudova koje dovode do poremećaja protoka krvi i ishemije, što je preduslov za progresiju bolesti ka proliferativnom stadijumu (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017). Venske brojanice predstavljaju kliničku manifestaciju dilatacije venula i vrećastih mikroaneurizmi na istom segmentu krvnog suda (Wu, 2010). Intraretinalne vaskularne abnormalnosti (engl. Intraretinal Microvascular Abnormalities, IRMA) predstavljaju arteriolarno-venularne šantove izgrađene od dilatiranih acelularnih kapilara, koji dovode do smanjenja protoka krvi kroz kapilarno korito (Wu, 2010). Mikroinfarkcije nastale zbog okluzije prekapilarnih arteriola u sloju nervnih vlakana nazivaju se meki eksudat (slika 2) ili „cotton- wool“ plaže (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017). Neproliferativna dijabetesna

retinopatija se deli na blagu, umerenu i tešku, u zavisnosti od vrste i broja morfoloških promena prisutnih u retini (tablela 1).



Slika 2. Klinička slika dijabetesne retinopatije (Eyeops, 2019).

Proliferativna dijabetesna retinopatija je uznapredovali stadijum bolesti koji se karakteriše neoangiogenozom koja nastaje kao odgovor na hipoksiju (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017). Novi krvni sudovi najčešće izrastaju iz retinalnih venula lociranih na obodima polja bez perfuzije (Wu, 2010). Novostvoreni krvni sudovi su fragilni i vrlo često rastu i van retine, urastajući u okolne strukture, najčešće u staklasto telo. Kako se sa starenjem menja sadržaj vode u staklastom telu, dolazi do njegovog smanjenja, što dovodi do kidanja krvnih sudova, krvarenja u staklastom telu i naglog gubitka vida. Neovaskularizacija (slika 2) je udružna sa proliferacijom fibroznog tkiva koja dovodi do nastanka ožiljaka koji izazivaju trakciju i odlublјivanje (ablaciju) retine ili dela retine što rezultuje slepilom (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017; Wu, 2010). Ponekad neovaskularizacija može da zahvati i dužicu i da se proširi do ugla prednje očne komore, gde izaziva opstrukciju oticanja očne vodice i akutni glaukom (American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel, 2017).

1.3. Patogeneza dijabetsne retinopatije

1.3.1. Strukturne i funkcionalne promene neurovaskularne jedinice i krvno-retinalne barijere u dijabetesnoj retinopatiji

Pre nego što se javi oštećenje ili nagli gubitak vida, u retini obolelih od dijabetesa melitusa dolazi do disfunkcije krvno-retinalne barijere, promena u protoku krvi kroz retinu i neuronalne i glijalne disfunkcije. U dijabetesu melitusu zapravo dolazi do suptilnih promena u komunikaciji između neurona, glijalnih ćelija i ćelija krvnih sudova (Gardner i Davila, 2017), što dovodi do dezintegracije neurovaskularne jedinice, pa prema tome, po mišljenju nekih autora, dijabetesna retinopatija predstavlja oblik senzorne neuropatije ili neurovaskularne degeneracije, pre nego mikrovaskularnu komplikaciju dijabetesa melitusa (Antonetti i sar., 2012; Stem i Gardner, 2013).

U dijabetesu može doći do oštećenja samo unutrašnje ili samo spoljašnje, ali i obe krvno-retinalne barijere (Klaassen i sar., 2013; Xu i Le, 2011). Povećanje propustljivosti krvno-retinalne barijere nastaje usled povećanja paracelularnog i transcelularnog transporta, zbog narušavanja građe i funkcije tesnih veza između endotelnih ćelija sa jedne strane i kvalitativnih i kvantitativnih promena endotelijalnog kaveolarnog transporta sa druge strane (Klaassen i sar., 2013; Wisniewska-Kruk i sar., 2014). Iako oba mehanizma omogućavaju nekontrolisani transport tečnosti i u njoj rastvorenih materija u retinu, aktivni transcelularni transport proteina krvne plazme, prema Starlingovom zakonu, dovodi do povećanja osmotskog pritiska u intersticijumu i predstavlja najznačajniji faktor za nastanak makularnog edema (Klaassen i sar., 2013).

U osnovi disfunkcije krvno-retinalne barijere u dijabetesu leže hiperglikemija, hipoksija, oksidativni stres i inflamacija (Klaassen i sar., 2013). Leukostaza, tj. adheriranje leukocita na zid kapilara retine, dodatno narušava endotelnu funkciju i posreduje u oštećenju krvno-retinalne barijere. Smatra se da leukociti doprinose razvoju dijabetesne retinopatije sekrecijom citokina, stvaranjem slobodnih radikala ili fizičkom okluzijom retinalnih krvnih sudova koja dovodi do ishemije (Tang i Kern, 2011).

Kapilarna degeneracija koja se viđa u dijabetesnoj retinopatiji karakteriše se gubitkom pericita i endotelnih ćelija pri čemu se kapilari prezentuju kao prazne cevi

(acelularni kapilari) na kojima se javljaju proširenja, mikroaneurizme. Odnos između broja endotelnih ćelija i broja pericita u kapilarima retine, koji je normalno 1:1, u dijabetesnoj retinopatiji je izmenjen i iznosi 4:1 (Klaassen i sar., 2013; Wu, 2010). U toku progresije bolesti dolazi do zadebljanja bazalne membrane kapilara, što kompromituje protok krvi kroz retinu (Gardiner i sar., 2007). Smatra se da zadebljanje bazalne membrane nastaje kao posledica povećane sinteze proteina koji učestvuju u izgradnji membrane ili smanjene degradacije istih od strane proteolitičkih enzima (Kowluru i Chan, 2007).

U pokušaju da poprave narušenu funkciju krvno-retinalne barijere, endotelne ćelije proliferišu na unutrašnjoj strani bazalne membrane izazivajući okluziju krvnih sudova i ishemiju. Ishemija predstavlja stimulus za lučenje VEGF-a koji stimuliše neoangiogenezu (Kowluru i Chan, 2007). Pod dejstvom ovog faktora rasta stvaraju se novi kapilari koji rastu sa retinalnih vena prema unutrašnjosti oka, što narušava normalne strukturne odnose u oku i predstavlja korak ka potpunom gubitku vida, usled krvarenja u staklastom telu ili usled ablacije retine.

Kao posledica narušavanja funkcije neurovaskularne jedinice, u dijabetesu melitusu dolazi do oštećenja mehanizma autoregulacije protoka krvi kroz retinu (Gardner i Davila, 2017), pri čemu je narušen normalni vazokonstriktorni i vazodilatatorni odgovor na lokalne stimulse (Lott i sar., 2012; Pemp i sar., 2009). Kao posledica narušavanja mehanizma autoregulacije, krvni sudovi postaju dilatirani i na njima se javljaju mikroaneurizme (Klaassen i sar., 2013). Ponovno uspostavljanje normalnih mehanizama autoregulacije protoka krvi kroz retinu postiže se inhibicijom enzima inducibilne azot-monoksid sintaze (iNOS), što ukazuje na značaj povećane aktivnosti ovog enzima za patogenezu dijabetesne retinopatije (Newman, 2015).

Iako se dijabetesna retinopatija tradicionalno posmatra kao bolest krvnih sudova retine, patološki proces zahvata i glijalne ćelije i preko njih se reflektuje na funkcije neurona, ganglijskih, amakrinih ćelija, pa čak i fotoreceptora (Gastinger i sar., 2006). Savremena shvatanja dijabetesne retinopatije prepoznaju i neuronalnu i glijalnu disfunkciju i degeneraciju kao bitne karakteristike dijabetesne retinopatije (Gardner i Davila, 2017; Stem i Gardner, 2013). Disfunkcija neurona u ranoj fazi dijabetesne retinopatije se ogleda u poremećenoj glutaminergičkoj i dopaminergičkoj transmisiji i smanjenoj ekspresiji sinaptičkih proteina, dok glijalne ćelije imaju smanjen kapacitet za

interkonverziju glutamata i glutamina, smanjenu ekspresiju glutamat-aspartat transportera, i izmenjenu regulaciju kalcijumskih kanala (Gardner i Davila, 2017). U toku progresije bolesti, dolazi do gubitka neurona, usled ćelijske smrti (Stem i Gardner, 2013).

1.3.2. Molekularni mehanizmi uključeni u patogenezu dijabetesne retinopatije

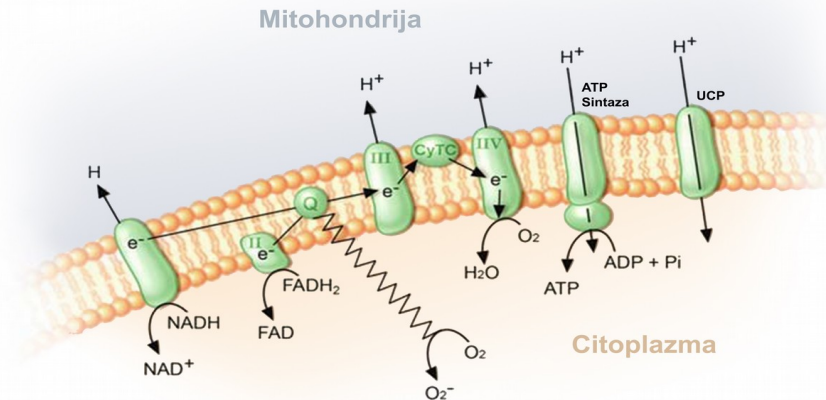
Molekularni mehanizmi kojima hiperglikemija izaziva nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije nisu tačno utvrđeni. Smatra se, ipak, da su u osnovi bolesti metabolička disfunkcija izazvana hiperglikemijom, oksidativni stres, inflamacija i apoptoza u retini.

1.3.2.1. Biohemijski poremećaji uzrokovani hiperglikemijom u dijabetesnoj retinopatiji

Brojnim epidemiološkim i kliničkim studijama utvrđen je značaj hronične hiperglikemije za razvoj i progresiju dijabetesne retinopatije (ACCORD Study Group and ACCORD Eye Group i sar., 2010; Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group i sar., 2015; Klein i sar., 1984; Matthews i sar., 2004; Stratton i sar., 2001). Iako je izvesno da upravo ona leži u osnovi metaboličkih poremećaja uključenih u patogenezu dijabetesne retinopatije, tačan mehanizam kojim hiperglikemija dovodi do nastanka i razvoja ove neurovaskularne komplikacije dijabetesa nije utvrđen.

Identifikovana su četiri metabolička puta kojima hiperglikemija može doprineti nastanku dijabetesne retinopatije. Ovde spadaju: put poliola, neenzimska glikacija proteina, aktivacija protein kinaze C (PKC) i biosinteza heksozamina (Brownlee, 2005). Zajednički imenitelj ovih metaboličkih puteva je povećana produkcija superoksidnog anjona od strane elektron transportnog lanca mitohondrija (slika 3) koja nastaje u uslovima hiperglikemije i dovodi do narušavanja ravnoteže između antioksidativnih i prooksidativnih sistema ćelije i stanja koje se naziva oksidativni stres (Brownlee, 2001,

2005; Giugliano i sar., 1996). Povećana koncentracija superoksidnog anjona inhibira enzim glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenazu (EC 1.2.1.12) i usmerava prekursore glicerinaldehid 3-fosfata u navedene metaboličke puteve (Brownlee, 2005).



Slika 3. Mehanizam stvaranja superoksidnog anjona na unutrašnjoj membrani mitohondrija u uslovima hiperglikemije (Stewart, 2010).

Put poliola omogućava metabolisanje viška glukoze u hiperglikemiji jer enzim aldoza reduktaza (EC 1.1.1.21) ima mali afinitet za glukozu (slika 4). Ovaj biohemijski proces podrazumeva konverziju glukoze u sorbitol pod dejstvom enzima aldoza reduktaze uz trošenje NADPH, da bi se zatim sorbitol konvertovao u fruktozu pod dejstvom sorbitol dehidrogenaze uz stvaranje NADH. Pošto je ćelijska membrana nepropustljiva za sorbitol, on ostaje zarobljen u ćeliji i dovodi do osmotskog oštećenja ćelija. Stvaranje sorbitola dovodi do potrošnje NADPH koji je koenzim i za enzim glutation reduktazu (EC 1.6.4.2) i na taj način smanjujući nivo redukovanog glutationa smanjuje i ukupni kapacitet antioksidativne zaštite. Proizvod fosforilacije fruktoze, fruktoza 3-fosfat i njegov degradacioni produkt 3-deoksiglukozon su agensi koji izazivaju glikaciju i dovode do stvaranja produkata uznapredovale glikacije (Stewart, 2010; Brownlee, 2005; Dehdashtian i sar., 2018).

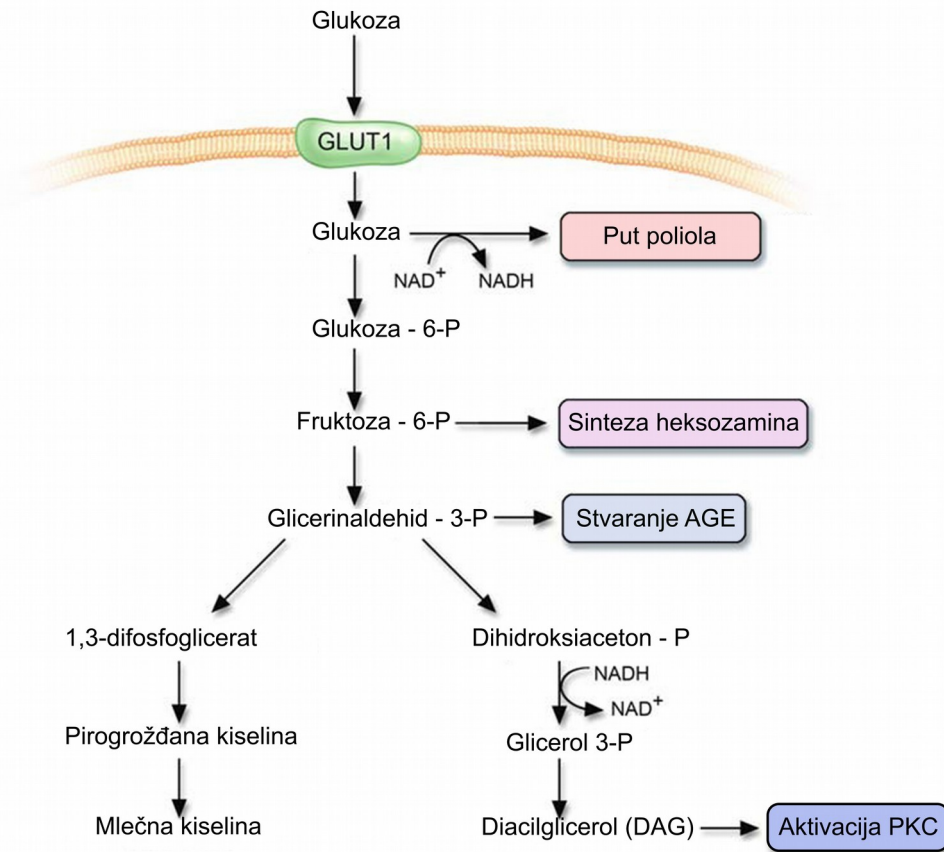
Krajnji proizvodi glikacije (AGE, engl. Advanced Glycation End Products) su heterogena grupa molekula koja nastaje u neenzimskoj reakciji redukujućih šećera sa slobodnim aminogrupama proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Metilglioksal koji

nastaje iz glicerinaldehid 3-fosfata predstavlja osnovni intracelularni prekursor AGE (slika 4). Molekularni rearanžmani i unakrsno povezivanje u molekulima proteina i lipida dovode do promene strukture i funkcije molekula koji grade ćelijski matriks, bazalnu membranu i zid krvnog suda. Molekuli AGE se vezuju za svoje receptore (RAGE, engl. Receptor For Advanced Glycation Endproducts) i na taj način ostvaruju prooksidativne i proinflamatorne efekte (Stewart, 2010; Brownlee, 2005). Ovi molekuli su medijatori svih mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa melitusa i povišeni su u serumu i retini dijabetičara, pri čemu njihov nivo korelira sa stadijumom retinopatije (Zong i sar., 2011). Proizvodi uznapredovale oksidacije proteina (engl. Advanced Oxidation Protein Products, AOPP) su strukturno slični AGE i ispoljavaju slične biološke efekte. Koncentracija AOPP je povišena u serumu obolelih od dijabetesa tip 1 i 2 (Kalousová i sar., 2002).

Protein kinaza C (PKC, EC 2.7.11.13) je serin/treonin kinaza koja igra ključnu ulogu u regulaciji brojnih ćelijskih funkcija i uključuje se u kompleksne puteve unutarćelijske signalizacije. Aktivira se porastom koncentracije diacilglicerola (DAG) i jona kalcijuma (Ca^{2+}) (Wilson i sar., 2015), ili alternativno, povećanjem koncentracije superoksida ili vodonik-peroksida (Geraldés i King, 2011). Hiperglikemija uslovljava intenziviranje procesa glikolize i povećano stvaranja intermedijera dihidroksiaceton fosfata, što za posledicu ima i povećano stvaranje DAG (Geraldés i King, 2011) i aktivaciju PKC (slika 4), što je verifikovano i kliničkim i eksperimentalnim studijama (Tarr i sar., 2013). Aktivacija izoformi PKC- α , PKC- β 1/2 i PKC- δ se smatra odgovornom za nastanak mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa melitusa, među kojima je i dijabetesna retinopatija (Geraldés i King, 2011). Inhibicija PKC- β 1/2 ima povoljne efekte na razvoj i progresiju dijabetesne retinopatije (Aiello i sar., 2006; Aiello i sar., 2011). Aktivacija PKC- β povezuje se prvenstveno sa promenama u retinalnom protoku, propustljivosti krvnih sudova, zatim endotelnom disfunkcijom i angiogenezom. Aktivacija PKC- δ dovodi do stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i aktivacije mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) što za posledicu ima apoptozom posredovan gubitak pericita, stvaranje acelularnih kapilara i mikroaneurizmi (Geraldés i sar., 2009).

Put biosinteze heksozamina omogućava stvaranje aminošćecera za reakcije glikozilacije molekula kao što su proteini i lipidi. Fruktosa 6-fosfat (slika 4) se pod

dejtstvom glutamin : fruktoza 6-fosfat amidotransferaze (GFAT, EC 2.6.1.16) konvertuje u glukozamin 6-fosfat (Brownlee, 2005). Acetilacijom, izomerizacijom i aktivacijom nastaje krajnji proizvod reakcije, UDP N-acetil glukozamin (UDP-GlcNAc) koji pod dejstvom enzima O-GlcNAc transferaze (EC 2.4.1.255) glikozidnom vezom vezuje serin i treonin u molekulima citoplazmatskih i nuklearnih proteina i na taj naćin reguliše njihovu funkciju kroz proces posttranslacione modifikacije (Yang i sar., 2008).



Slika 4. Mehanizam kojim hiperglikemija dovodi do biohemijskih poremećaja koji prethode nastanku dijabetesne retinopatije (Stewart, 2010).

1.3.2.2. Oksidativni stres u dijabetesnoj retinopatiji

Oksidativni stres se definiše kao stanje u kome postoji disbalans između stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i/ili azota i sposobnosti antioksidativnih zaštitnih sistema da izvrše njihovu neutralizaciju i uklanjanje. Ovo stanje dovodi do oštećenja

molekula koji učestvuju u izgradnji ćelije uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline.

Reaktivne vrste kiseonika (RVK) su molekuli koji sadrže kiseonik i imaju nesparene elektrone, usled čega su nestabilni i veoma reaktivni. U RVK spadaju vodonik-peroksid (H_2O_2), superoksidni anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) i singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$) (slika 5).

Superoksid nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Ćelije imunog sistema, pomoću membranskog enzima NAD(P)H oksidaze i citohroma P450 generišu značajne količine superoksida. Ovaj molekul je prekursor ostalih RVK molekula i peroksinitritnog anjona (slika 5). U reakciji superoksida sa vodonik-peroksidom u prisustvu Fe^{3+} jona stvara se hidroksilni radikal (Haber-Weiss-ova reakcija). U fiziološkim uslovima superoksid uklanja enzim superoksid dizmutaza (SOD, EC 1.15.1.1.) i prevodi ga u vodonik-peroksid (Kowluru, 2003).

Vodonik-peroksid u prisustvu Fe^{2+} jona, parcijalnom redukcijom gradi hidroksilni radikal (Fentonova reakcija). Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) razlaže vodonik-peroksid u fiziološkim uslovima na vodu i molekulski kiseonik. Glutation peroksidaza (GPx, EC 1.11.1.9) takođe ima sposobnost detoksikacije vodonik-peroksida, ali i hidroperoksida masnih kiselina u prisustvu redukovano glutaciona (GSH).

Singletni kiseonik nastaje iz molekulskog kiseonika u prisustvu svetlosti i fotosenzitizera (Kowluru, 2003).

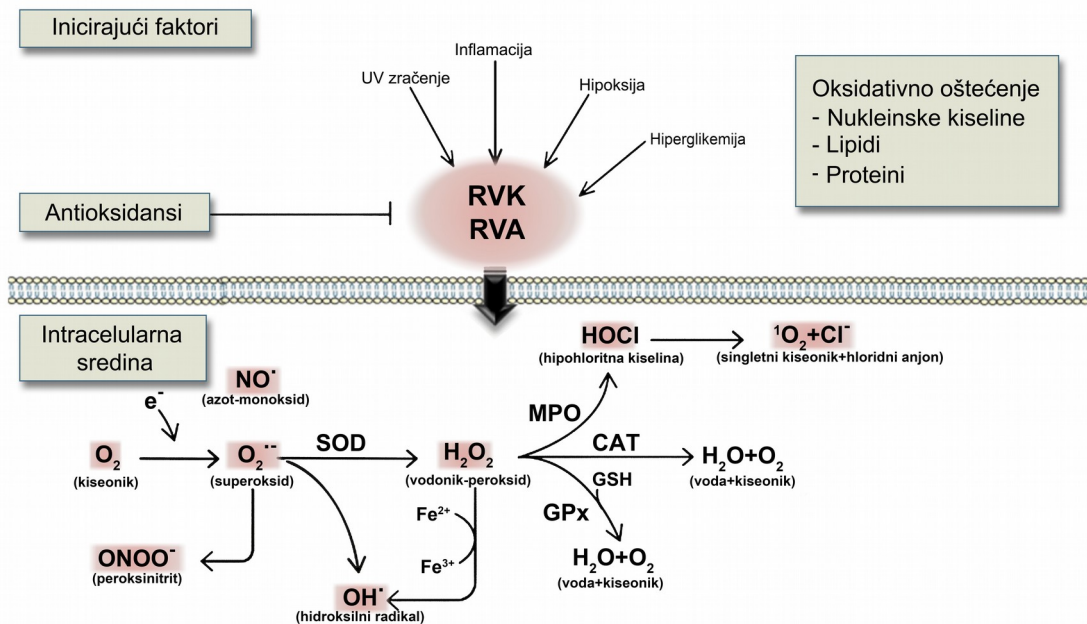
U reaktivne vrste azota (RVA) spadaju azot-monoksid (NO) radikal, azot dioksid (NO_2) radikal i peroksinitrit (ONOO^-).

Azot-monoksid nastaje iz L-arginina katalitičkom akcijom jedne od izoformi enzima azot-monoksid sintaze (neuralna nNOS; endotelijalna eNOS; inducibilna iNOS) u prisustvu kiseonika i NADPH (Kowluru, 2003). U fiziološkim uslovima NO proizvode enzimi nNOS i eNOS i njegovi efekti su održavanje normalne okularne hemodinamike i neuroprotekcija (Das, 2017). Veće koncentracije NO stvaraju se pod dejstvom iNOS i povezuju se sa nastankom mnogih oboljenja oka, kao i dijabetesne retinopatije (Zheng i Kern, 2009).

Peroksinitritni anjon nastaje u reakciji superoksida i NO. Protonovanjem peroksinitrita nastaje nestabilna peroksinitritna kiselina, koja se razlaže na hidroksilni i

azot-dioksid radikal. Peroksinitrit je moćan oksidant koji reaguje sa membranskim lipidima (lipidna peroksidacija), proteinima (oksidacija i nitrovanje tirozina) i nukleinskim kiselinama (prekidi DNK) izazivajući njihova oštećenja (Kowluru, 2003).

Sem enzima antioksidativne zaštite, koji omogućavaju neutralizaciju SOD, CAT i GPx za antioksidativnu zaštitu značajni su biomolekuli kao što je glutation, proteini koji vezuju gvožđe i neenzimski antioksidansi.



Slika 5. Oksidativni stres, mehanizam stvaranja RVK/RVA i mehanizmi antioksidativne zaštite.

Retina je posebno podložna oksidativnom stresu zbog, relativno visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na ostala tkiva, visokih zahteva za energijom i izloženosti UV zračenju (Kumari i sar., 2008). Oksidativni stres u retini ne utiče samo na nastanak i razvoj dijabetesne retinopatije, već izaziva i fenomen metaboličkog pamćenja, koji sprečava regresiju dijabetesne retinopatije nakon normalizovanja glikemije (Kowluru, 2017, 2003; Mishra i Kowluru, 2016). Koncentracija superoksida (Du i sar., 2003) i vodonik-peroksida (Ellis i sar., 2000) je povišena u retini dijabetičnih pacova, kao i u kulturi ćelija retine u uslovima hiperglikemije (Du i sar., 2003). Koncentracija peroksinitritnog anjona je takođe povišena u retini dijabetičnih pacova (Zheng i Kern, 2009). Sem povećane produkcije RVK, oksidativni stres u dijabetesu je dodatno potenciran smanjenim kapacitetom antioksidativnih enzimskih sistema,

smanjenom koncentracijom glutationa i neenzimskih antioksidanasa (Haskins i sar., 2003; Kowluru i Chan, 2007).

Retina je posebno podložna procesu lipidne peroksidacije zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (Tarr i sar., 2013). Tiobarbiturat reagujuće supstance (TBARS) predstavljaju krajnje proizvode lipidne peroksidacije identifikovane u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom, pri čemu je malondialdehid (MDA) jedan od najzastupljenijih finalnih proizvoda peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina.

Vrednosti parametara koji ukazuju na intenzitet lipidne peroksidacije (TBARS, MDA), oksidativno oštećenje proteina (AOPP) i nukleinskih kiselina (8-hidroksi-dezoksiguanozin, 8-OHdG) su povišene u retini u dijabetesu (Kowluru i Chan, 2007; Kowluru, 2001; Özdemir i sar., 2014; Salido i sar., 2012). Povišene koncentracije biomarkera oksidativnog stresa u krvi, i to TBARS, MDA, AOPP, karbonilnih grupa, 8-OHdG, takođe su udružene sa povećanim rizikom za razvoj dijabetesne retinopatije (Al-Shabrawey i Smith, 2010).

Oštećenja makromolekula i ćelijskih struktura nastala kao posledica oksidativnog stresa u retini dovode do inflamacije i ćelijske smrti.

1.3.2.3. Inflamacija i neoangiogeneza u dijabetesnoj retinopatiji

Inflamacija je odbrambena reakcija posredovana imunim sistemom na prisustvo mikroorganizama ili stranih antigena, koja na molekularnom i celularnom nivou, uključuje aktivaciju leukocita i brojnih molekularnih medijatora inflamacije (Dehdashtian i sar., 2018). Akutna inflamacija ostvaruje povoljne efekte na tkiva i rezultuje reparacijom, dok hronična inflamacija dovodi do oštećenja tkiva i ćelijske smrti (Hotamisligil, 2006).

Hiperglikemija, oksidativni stres i sa njim udruženi metabolički poremećaji doprinose nastanku inflamacije u dijabetesnoj retinopatiji, pri čemu ovaj proces ima hroničan tok (Tang i Kern, 2011; Tarr i sar., 2013). Oštećenja makromolekula i ćelijskih struktura nastala pod dejstvom RVK i/ili RVA, čije je stvaranje povećano u uslovima hiperglikemije, predstavljaju okidač inflamatornog odgovora u retini (Kowluru i Chan, 2007). Nakon iniciranja imunog odgovora oksidativnim oštećenjem u retini, proces

dalje progredira pod dejstvom proinflammatoryh citokina, adhezionih molekula, faktora rasta i NO-produkujućih enzima (Kaul i sar., 2010; Roy i sar., 2017; Tarr i sar., 2013).

Subklinička inflamacija, koja se karakteriše promenama u cirkulišućim i lokalnim koncentracijama proinflammatoryh molekula, je bitna karakteristika mikrovaskularnih komplikacija dijabetesa (Kaul i sar., 2010). Povećana ekspresija proinflammatoryh proteina je regulisana povećanom aktivacijom proinflammatoryh faktora transkripcije kakav je nuklearni faktor kapa B (NF- κ B). (Tang i Kern, 2011).

Leukostaza značajno doprinosi mikrovaskularnom oštećenju u retini. Leukociti adheriraju na zid krvnih sudova nakon vezivanja za vaskularni (VCAM-1) ili interćelijski adhezioni molekul 1 (ICAM-1) na površini endotelnih ćelija (Tarr i sar., 2013). Pored fizičke okluzije kapilara, leukociti oslobađaju citokine, faktore rasta i stvaraju RVK na taj način doprinoseći kapilarnoj degeneraciji i povećanju propustljivosti krvno-retinalne barijere (Patel, 2009; Tarr i sar., 2013). Oštećenje retinalnih krvnih sudova i strukture tesnih spojeva, koje za posledicu ima narušavanje integriteta krvno-retinalne barijere, smatra se ključnim za nastanak dijabetesne retinopatije (Dehdashtian i sar., 2018; Klaassen i sar., 2013).

Lokalna inflamatorna reakcija u dijabetesnoj retinopatiji, koja podrazumeva aktivaciju glijalnih ćelja, tkivnih makrofaga i leukocita, udružena je sa povećanim stvaranjem RVK, proinflammatoryh citokina, matriks metaloproteinaza, adhezionih molekula i NO, koji zajedničkom akcijom doprinose oštećenju krvno-retinalne barijere, gubitku retinalnih neurona i oštećenju vida (Altmann i Schmidt, 2018; Tarr i sar., 2013).

Faktor nekroze tumora- α (TNF- α) je proinflammatory citokin koji se proizvodi aktiviranim makrofagima, leukocitima i neuronima. U retini se stvara u Milerovim glijalnim ćelijama i ganglijskim ćelijama (Tarr i sar., 2013). Ovaj proinflammatory citokin izaziva tkivnu inflamaciju posredstvom efekta na proizvodnju RVK ili aktivacijom signalnih puteva u ćelijama, pre svega posredstvom c - Jun N - terminalne kinaze (JNK) i NF- κ B (Akash i sar., 2018). Ovaj molekul može da prouzrokuje endotelnu disfunkciju, delujući na produkciju RVK u neutrofilima i smanjenjem koncentracije NO u endotelu krvnih sudova (Das, 2017). U endotelu TNF- α stimuliše sintezu adhezionih molekula, čime doprinosi nastanku leukostaze (Thichanpiang i Wongprasert, 2015). Posredstvom efekta na PKC ζ / NF- κ B, TNF- α povećava propustljivost krvno-retinalne barijere (Aveleira i sar., 2010). Smatra se da TNF- α može

biti sistemski faktor koji doprinosi nastanku dijabetesne retinopatije, jer se oslobađa iz makrofaga masnog tkiva u dijabetesu melitusu i gojaznosti, dovodeći do sistemske inflamacije (Fasshauer i Paschke, 2003; Stem i Gardner, 2013). Ovaj molekul igra ključnu ulogu u nastanku leukostaze u retini i narušavanju integriteta krvno-retinalne barijere (Aveleira i sar., 2010; Huang i sar., 2011), samim tim i u razvoju dijabetesne retinopatije. Efekti TNF- α posredovani su preko dva tipa membranskih receptora, TNFR1 i TNFR2.

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) je proinflamatorni citokin koji se poroizvodi u Milerovim glijalnim ćelijama retine, retinalnom pigmentnom epitelu, ganglijskim ćelijama, pericitima i endotelnim ćelijama kao odgovor na hipoksiju (Tarr i sar., 2013). Pored hipoksije, hiperglikemija i oksidativni stres izazivaju povećanu sintezu VEGF-a (Marazita i sar., 2016; Sone i sar., 1996). Efekti VEGF-a na endotelne ćelije su posredovani membranskim receptorima koji imaju tirozin kinaznu aktivnost. Hipoksija stimuliše sintezu VEGF-a posredstvom DNK vezujućeg proteina, hipoksija inducibilnog faktora 1 (HIF1) (Zhang i sar., 2018), a njegovi efekti su povećanje propustljivosti krvno-retinalne barijere (Klaassen i sar., 2013; Tarr i sar., 2013), vaskulogeneza i angiogeneza (Gupta i sar., 2013). Novi krvni sudovi nastaju proliferacijom i migracijom endotelnih ćelija, koja je omogućena degradacijom bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa od strane matriks metaloproteinaza (Gupta i sar., 2013). Matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9) povećava bioraspoloživost VEGF-a, čime potencira njegovo dejstvo (Di i sar., 2016; Ebrahim i sar., 2010).

1.3.2.4. Ćelijska smrt u dijabetesnoj retinopatiji

Ćelijska smrt se smatra značajnom za nastanak tipičnih morfoloških karakteristika dijabetesne retinopatije poput mikroaneurizmi i acelularnih kapilara, kao i narušavanja barijerne funkcije krvno-retinalne barijere (Feenstra i sar., 2013). Mehanizmi ćelijske smrti koji se smatraju značajnim za patogenezu dijabetesne retinopatije su apoptoza i piroptoza (Crooke i sar., 2017).

Apoptoza je do danas najviše izučavan vid ćelijske smrti i može biti pokrenuta spoljašnjim ili unutrašnjim putem koji se međusobno razlikuju u načinu aktivacije i inicijatornim kaspazama. Za oba puta je zajedničko aktiviranje izvršnih kaspaza, među

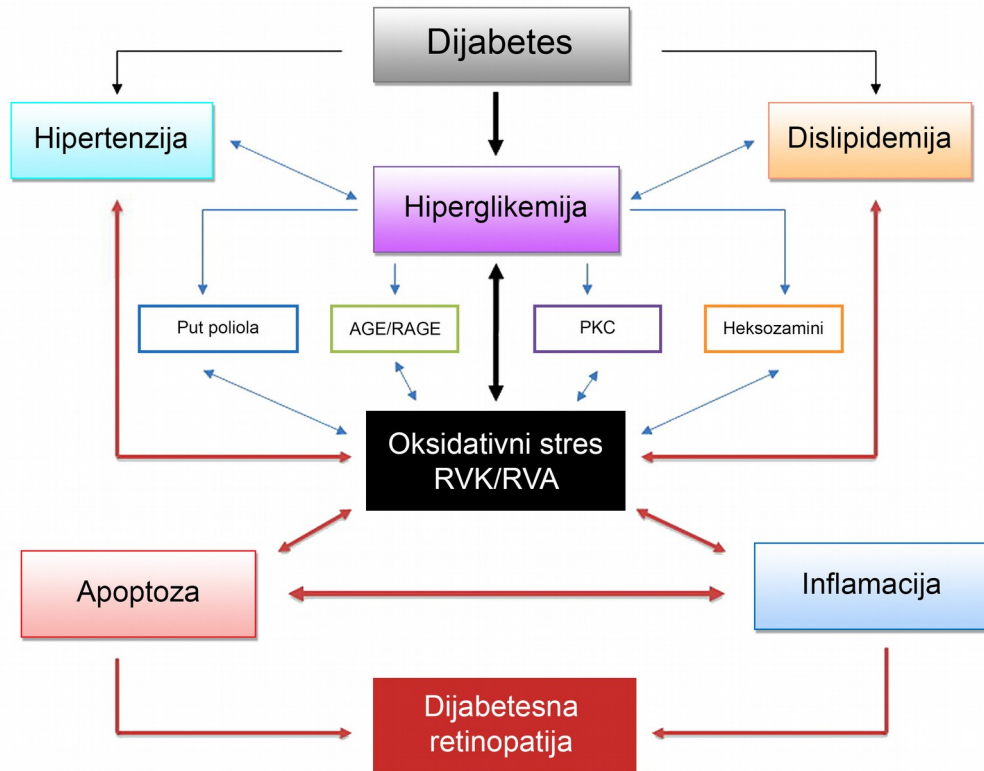
kojima je i kaspaza-3 koja posredstvom biohemijskih promena u ćeliji posreduje u nastanku ćelijske smrti.

Spoljašnji put apoptoze započinje vezivanjem signala smrti (FAS ligand, TNF- α , TRAIL ligand) za receptore smrti, nakon čega se formira signalni kompleks smrti (engl. death-inducing signaling complex- DISC), koji pokreće aktivaciju kaspaza i apoptozu (Galluzzi i sar., 2012). Unutrašnji put apoptoze započinju različiti vidovi oštećenja ćelije, ćelijskih organela i unutarćelijskih makromolekula, do kojih između ostalog može dovesti i oksidativni stres (Feenstra i sar., 2013). Bez obzira na put aktivacije apoptoze, proces podrazumeva nastanak pora na membrani mitohondrija, pod dejstvom Bax/Bak proteina i izlazak citohroma c, apoptoza indukujućeg faktora i endonukleaze G u citozol, što rezultuje stvaranjem apoptozoma i aktivacijom kaspaza-9 i -3 (Galluzzi i sar., 2012; Kroemer i sar., 2007). Kaspaza-3, pritom, učestvuje u kondenzaciji hromatina i fragmentaciji DNK što je tipična karakteristika apoptoze (Galluzzi i sar., 2012). Apoptoza indukujući faktor i endonukleaza G mogu dodatno posredovati u nastanku apoptoze kaspaza nezavisnim mehanizmom (Feenstra i sar., 2013; Galluzzi i sar., 2012).

Piroptoza je ćelijska smrt posredovana inflamacijom i zavisna od aktivacije kaspaze-1 i inflamazoma NLRP3 (engl. NLR family, pyrin domain containing 3) (Feenstra i sar., 2013). Kaspaza-1 aktivira se posredstvom multiproteinskog kompleksa inflamazoma NLRP3, da bi zatim učestvovala u prevođenju neaktivnih prekursora interleukina 1 β (IL-1 β) i interleukina 18 (IL-18) u aktivne forme, ali i aktivaciji proteina gasdermina-D koji učestvuje u nastanku pora na ćelijskoj membrani (Feenstra i sar., 2013; Shi i sar., 2015). Stvaranje pora na ćelijskoj membrani u toku piroptoze dovodi do influksa vode, bubrenja ćelije i pucanja ćelijske membrane, za razliku od apoptoze koja se karakteriše kondenzacijom hromatina i stvaranjem apoptotičnih telašaca (Duprez i sar., 2009).

Sem ćelija koje učestvuju u izgradnji krvnih sudova, apoptoza u dijabetesnoj retinopatiji pogađa i Milerove ćelije, ganglijske ćelije, astrocite i fotoreceptore i usko je povezana sa oksidativnim stresom (Stem i Gardner, 2013). Smatra se da RVK iniciraju apoptozu oštećujući membranu ćelije lipidnom peroksidacijom i narušavajući ćelijske funkcije i unutarćelijsku signalizaciju oksidativnim oštećenjem proteina i nukleinskih kiselina (Kowluru i Chan, 2007).

Matriks metaloproteinaza 9 ispoljava proapoptotično dejstvo na ćelije retine, najverovatnije posredujući u oštećenju membrane mitohondrija (Chen i sar., 2015; Kowluru i Shan, 2017).



Slika 6. Šematski prikaz patogeneze dijabetesne retinopatije. Faktori rizika, biohemijski poremećaji i molekularni mehanizmi uključeni u njen nastanak i progresiju (Gong i Rubin, 2015)

1.3. Profilaksa i terapija dijabetesne retinopatije

Najbolja terapija dijabetesne retinopatije je njena prevencija. Stroga kontrola glikemije višestruko smanjuje rizik od gubitka vida usled dijabetesne retinopatije. Pored hirurške terapije dijabetesne retinopatije u vidu laser fotokoagulacije i vitektomije, danas se primenjuje i intraokularna medikamentozna terapija anti-VEGF agensima i kortikosteroidima (Cheung i sar., 2014).

Bolje poznavanje patogeneze dijabetesne retinopatije pruža mogućnost za razvoj novih medikamenata, kojima se može efikasno uticati na progresiju bolesti. Cilj je pronalaženje efikasnog leka, koji bi bio bezbedan za dugotrajnu primenu, a ispoljavao

mali broj neželjenih efekata i koji bi bio podjednako efikasan u ranoj i kasnoj fazi dijabetesne retinopatije (Stewart, 2016).

Aktuelna istraživanja ukazuju na značaj stimulacije Nrf2/ARE signalnog puta u terapiji dijabetesne retinopatije (Deliyanti i sar., 2018), što ukazuje na potencijal terapije dijabetesne retinopatije melatoninom (Hristova i sar., 2015; Shah i sar., 2017) oralno ili lokalno.

1.4. Melatonin

Melatonin (N-acetil 5-metoksi triptamin) je derivat esencijalne aminokiseline triptofana. Molekul melatonina je prvi put izolovan 1958. godine iz pinealne žlezde govečeta (Lerner i sar., 1958).

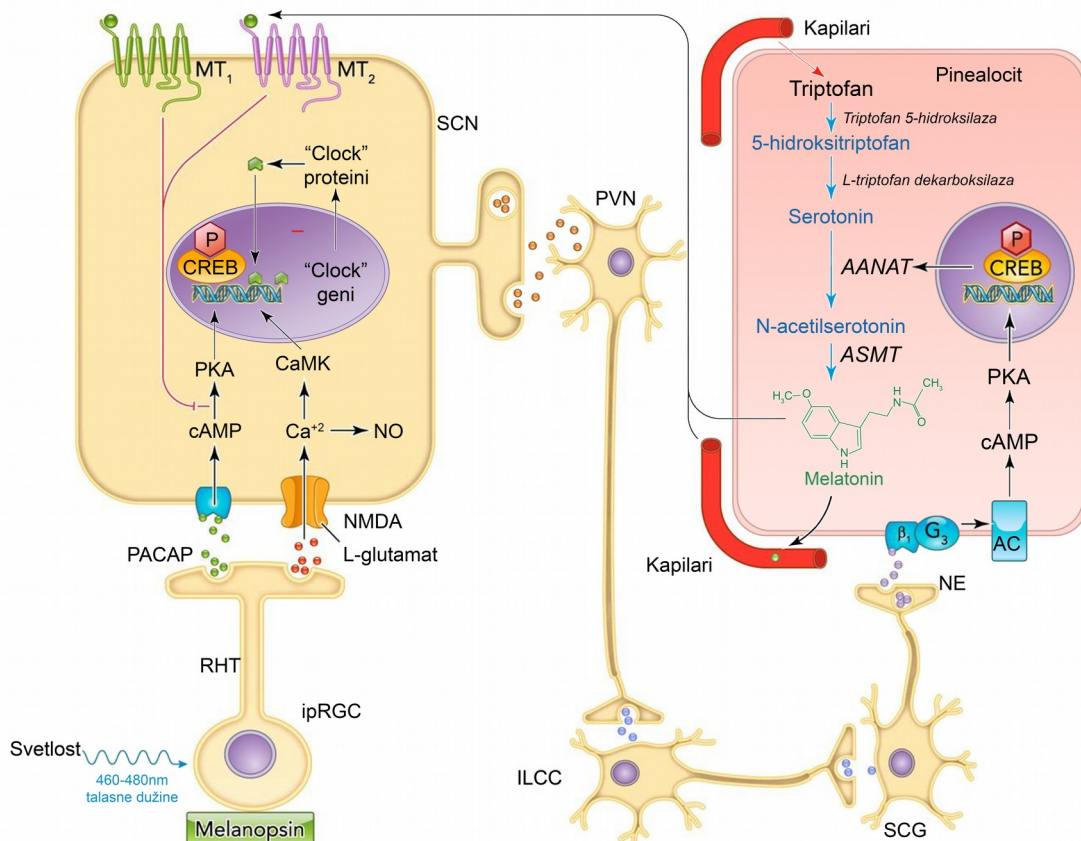
Sposobnost sinteze molekula melatonina imaju gotovo sve životinjske i biljne vrste, čak i bakterije i jednoćelijski organizmi (Reiter i sar., 2003). Kod kičmenjaka, najveći deo cirkulišućeg melatonina se sintetiše u pinealnoj žlezdi. Pored toga, melatonin se sintetiše i u retini (Tosini i Menaker, 1998), gastrointestinalnom traktu (Bubenik, 2002), koži (Slominski i sar., 2008), limfocitima (Carrillo-Vico i sar., 2004) i kostnoj srži (Conti i sar., 2000) kičmenjaka, ali tu ostvaruje prvenstveno parakrine i autokrine efekte.

1.4.1. Biosinteza melatonina

Sinteza melatonina iz triptofana se odvija kroz četiri enzimske reakcije (slika 7). Najpre se u mitohondrijama pod dejstvom triptofan hidrosilaze (EC 1.14.16.4) sintetiše 5-hidroksitriptofan koji se konvertuje u serotonin pod dejstvom 5-hidroksitriptofan dekarboksilaze (EC 4.1.1.28) u citozolu. Serotonin se zatim acetiliše pod dejstvom enzima arilalkilamin N-acetil transferaze (AANAT; EC 2.3.1.87) u N-acetil serotonin. Metilacijom N-acetil serotonin pod dejstvom hidroksiindol-O-metil transferaze/acetil serotonin metil transferaze (HIOMT/ASMT; EC 2.1.1.4) nastaje melatonin (Simonneaux i Ribelayga, 2003; Reiter i sar., 2014, 2016; Slominski i sar., 2012).

1.4.2. Regulacija biosinteze melatonina

Biosinteza melatonina regulisana je kompleksnim mehanizmom lociranim u suprahijazmatskom jedru hipotalamusa (engl. suprachiasmatic nucleus, SCN) (Perreau-Lenz i sar., 2004), čiji neuroni ispoljavaju 24-časovnu ritmičnu aktivnost koja se ogleda u ritmičnoj ekspresiji oscilirajućih (engl. clock) gena (Benarroch, 2008). Ovo jedro kontroliše sintezu melatonina preko multisinaptičkog puta (slika 7).



Slika 7. Biosinteza melatonina. Regulacija biosinteze melatonina (Reiter i sar., 2014).

Legenda: ipRGC, fotoreceptivne retinalne ganglijske ćelije; SCN, suprahijazmatsko jedro; PVN, paraventrikularno jedro; ILCC, intermediolateralni rogovi kičmene moždine; SCG, gornje cervikalne ganglije; AANAT, arilalkilamin N-acetil transferaza; AC, adenil ciklaza; ASMT, acetilserotonin metil transferaza; CaMK, kalcijum/kalmodulin protein kinaza; cAMP, ciklični adenzin monofosfat; CREB (engl. cAMP response element-binding protein); NE, noradrenalin; NMDA, N-metil-D-aspartat receptor; NO, azot monoksid; PACAP, pituitarni adenil ciklaza-aktivirajući peptid; PKA, protein kinaza A; RHT, retinohipotalamički trakt.

Neuroni SCN-a, koji primaju vlakna retinohipotalamičkog puta, inhibiraju neurone paraventrikularnog jedra hipotalamusa, čiji se aksoni spuštaju do

preganglijskih simpatičkih neurona smeštenih u bočnom rogu cervikalnog segmenta kičmene moždine, a koji putem gornjih cervikalnih ganglija daju inervaciju za pinealnu žlezdu (Benarroch, 2008).

Glavni neurotransmiter kojeg oslobađaju postganglijska vlakna odgovorna za inervaciju pinealne žlezde, a koji reguliše sintezu melatonina je noradrenalin. Noradrenalin, oslobođen iz postganglijskih nervnih vlakana, ostvaruje inhibitorne efekte na sintezu melatonina vezujući se za β - i α 1- adrenergičke receptore. Nakon vezivanja za β -adrenergičke receptore, noradrenalin, dovodi do porasta intracelularnog cAMP u pinealocitima i aktivacije cAMP zavisne protein kinaze A, koja fosforiliše i inhibira glavni regulatorni enzim biosinteze melatonina AANAT (Schomerus i sar., 2002). Alfa-1 adrenergički receptori aktivirani noradrenalinom, dodatno potenciraju β -adrenergičku aktivnost porastom intracelularne koncentracije kalcijuma i aktivacijom protein kinaze C (Krause i Dubocovich, 1990).

Sinteza melatonina inhibirana je u uslovima izloženosti vidljivoj svetlosti (talasne dužine od 460 do 480 nm), impulsima koji se prenose iz suprahijazmatskog u paraventrikularno jedro hipotalamusa. Smanjenje izloženosti svetlu dovodi do popuštanja ove inhibicije, čime se aktivira sinteza melatonina. Dodatno, melatoninski receptori su prisutni na neuronima suprahijazmatskog jedra, što sugeriše da je sinteza melatonina, kao i kod većine ostalih hormona, regulisana mehanizmom negativne povratne sprege (Waly i Hallworth, 2015).

1.4.3. Katabolizam melatonina

Melatonin je lipofilni molekul (indolamin) i ne deponuje se u pinealnoj žlezdi već difunduje iz ćelija u krvotok. Poluživot melatonina u cirkulaciji je oko 20 minuta (Simonneaux i Ribelayga, 2003).

Kod pacova i ljudi, najveći značaj ima klasični hepatični put razgradnje u toku koga se melatonin najpre hidroksiliše putem CYP P450 enzima (CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1) u 6-hidroksimelatonin, zatim konjuguje sa aktivnim sulfatom ili glukuronskom kiselinom i izlučuje urinom (Ma i sar., 2005). Alternativni indolski put u toku koga iz melatonina nastaju 5-metoksi indol-sirćetna kiselina i 5-metoksitriptofol,

kao i kinurički put u toku koga nastaje N1-acetil-N2-formil-5-metoksikinuramin su od manjeg značaja za katabolizam melatonina (Slominski i sar., 2012).

Zbog činjenice da se ne deponuje i da ima kratak poluživot, smatra se da koncentracija izmerena u serumu/plazmi u svakom trenutku verno odražava sintezu melatonina u pinealnoj žlezdi (Simonneaux i Ribelayga, 2003). Koncentracija melatonina u krvi opada sa starenjem, i u nekim oboljenjima kao što su tumori, Alchajmerova bolest, kardiovaskularna oboljenja i dijabetes melitus (Reiter i sar., 2014; Peschke i sar., 2006).

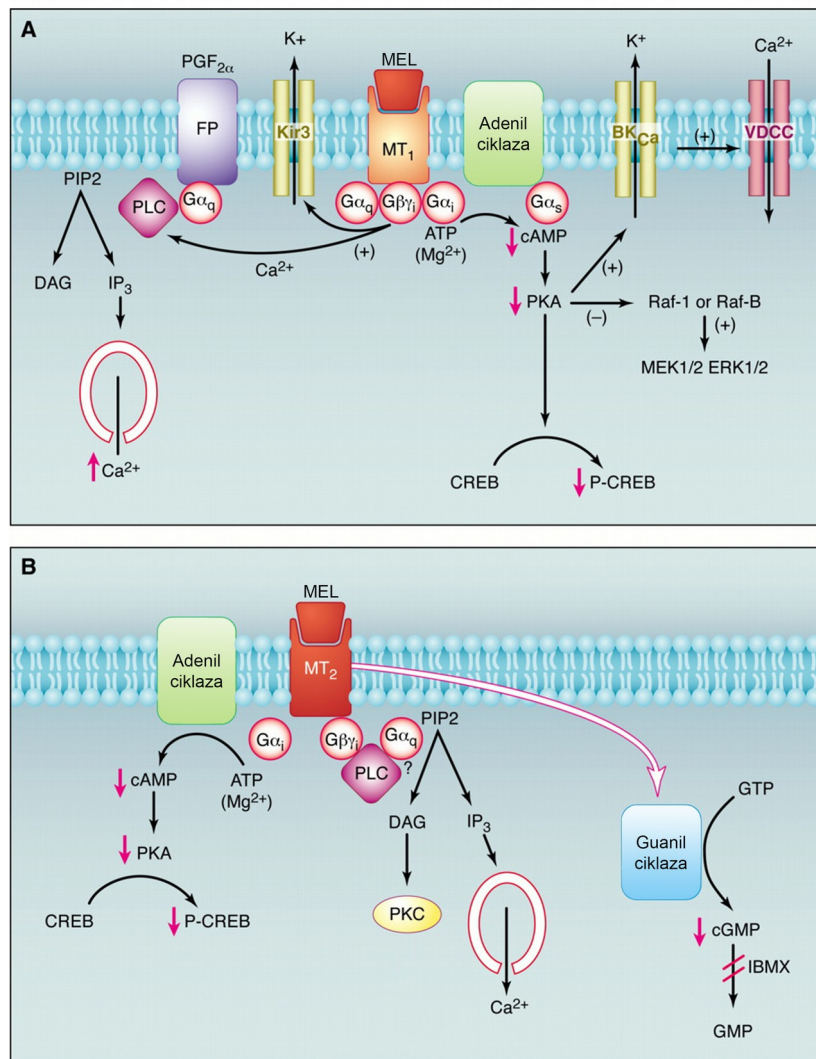
1.4.4. Melatoninski receptori

Melatonin većinu svojih efekata ostvaruje putem dve vrste membranskih receptora, MT1 i MT2. Melatoninski receptori 1/2 (MT1/MT2) su G protein spregnuti (sedam-transmembranski domen) receptori.

Melatoninski receptor 1 (MT1) je integralni membranski protein izgrađen od 350 aminokiselina i udružen sa G_i i G_q subjedinicom (Slominski i sar., 2012). Aktivacija receptora udruženog sa G_i subjedinicom inhibira adenil ciklaznu aktivnost i dovodi do smanjene koncentracije cAMP u ćeliji, što konačno dovodi do smanjenja aktivnosti cAMP zavisne kinaze (protein kinaze A). Aktivacija receptora udruženog sa G_q subjedinicom dovodi do aktivacije fosfolipaze C (PLC), koja hidrolizuje fosfatidil-inozitol 4,5-bifosfat na DAG i inozitol 3-fosfat (IP_3). Diacilglicerol, kao sekundarni glasnik, aktivira protein kinazu C, a IP_3 povećava intracelularnu koncentraciju kalcijuma posredstvom efekta na kalcijumske kanale na membrani endoplazmatskog retikuluma i pokreće dalju signalizaciju preko kalmodulina (Slika 8A). Melatoninski receptori 1 (MT1) su pronađeni u mozgu, retini, kardiovaskularnom sistemu, imunom sistemu, polnim žlezdama, nadbubrežnoj žlezdi, koži, dojci, placenti, bubregu, jetri, slezini i pankreasu (Dubocovich i Markowska, 2005; Pandi-Perumal i sar., 2008; Slominski i sar., 2012).

Melatoninski receptor 2 (MT2) je integralni membranski protein izgrađen od 363 aminokiseline i udružen sa G_i subjedinicom (Slika 8B). MT2 receptor je predominantno prisutan u mozgu (hipotalamus, suprahijazmatski nukleus), ali je pronađen i u hipofizi, retini, imunom sistemu, polnim žlezdama, gastrointestinalnom

traktu, masnom tkivu i koži (Dubocovich i Markowska, 2005; Pandi-Perumal i sar., 2008; Slominski i sar., 2012).



Slika 8. Intraćelijska signalizacija posredovana aktivacijom melatoninskih MT1(A) i MT2 (B) receptora (Masana i Dubocovich, 2014).

Legenda: PIP2, fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat; PLC, fosfolipaza C; DAG, diacilglicerol; PKA, protein kinaza A; CREB (engl. cAMP-responsive element binding protein); ER, endoplazmatski retikulum; VDCC, voltažno-zavisni Ca $^{2+}$ kanal; BKCa, Ca $^{2+}$ -aktivirani K $^{+}$ kanal; FP, receptor za prostaglandin F2 α ; PGF2 α , prostaglandin F2 α ; IBMX, isobutilmetilksantini; ATP, adenzin trifosfat; MEL, melatonin; GTP, guanozin trifosfat; GMP, guanozin monofosfat.

“Melatoninski receptor 3 (MT3)” zapravo je enzim hinon reduktaza 2, uključen u zaštitu od oksidativnog stresa (Nosjean i sar., 2000). Pronađen je u jetri i bubregu, a u manjoj koncentraciji u kardiovaskularnom sistemu, mrkom masnom tkivu i mozgu (Nosjean i sar., 2000).

Melatonin se vezuje i za nuklearne receptore ROR/RZR subfamilije (retinoidni orfan receptori/ retinoidni Z receptori) (Carrillo-Vico i sar., 2003) i na taj način direktno deluje na proces transkripcije. Ovi nuklearni receptori imaju NH₂ terminalni, DNK vezujući, ligand vezujući domen, dvostruke cink prste i zglobni domen (Reiter i sar., 2014).

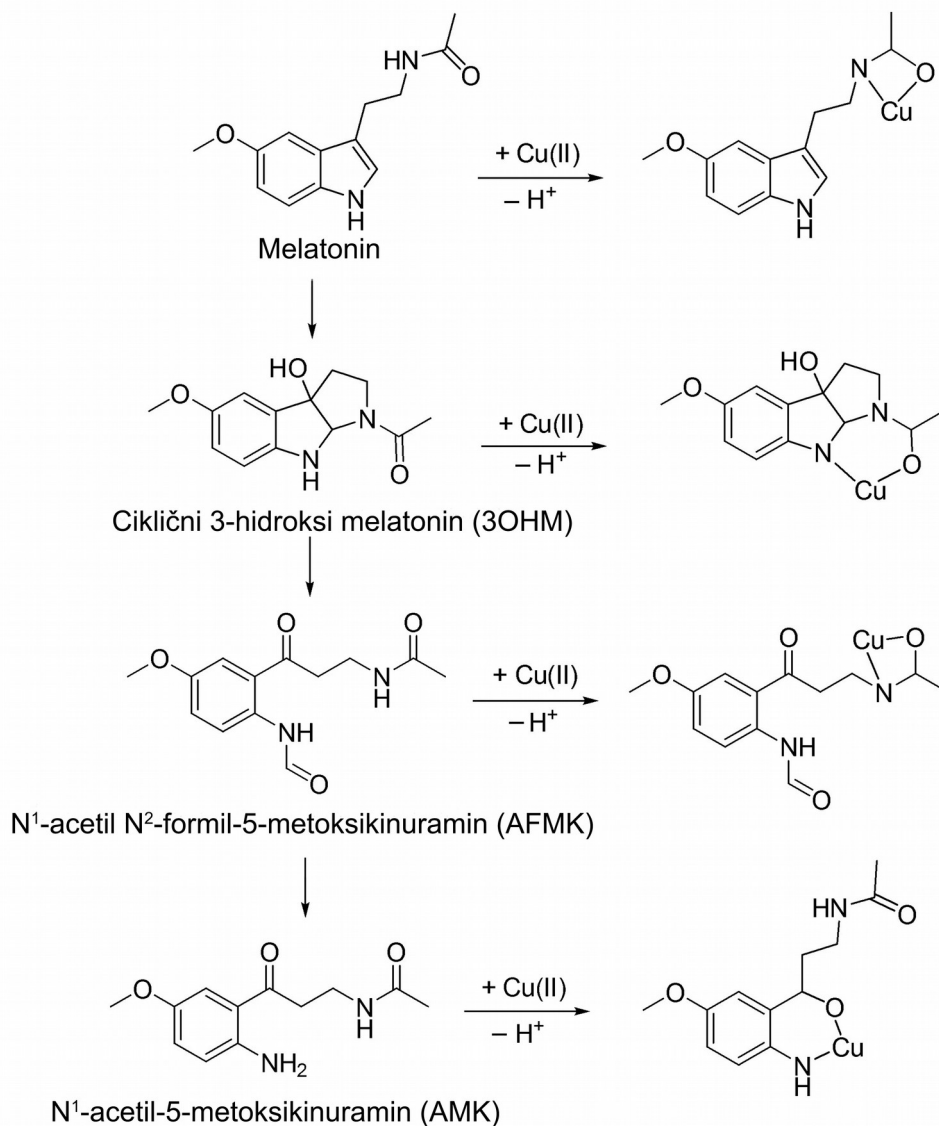
1.4.5. Antioksidativni i antiinflamatorni efekti melatonina

Molekul melatonina ima jako izražene anti-oksidativne sposobnosti. Melatonin, ali i njegovi metaboliti imaju sposobnost da direktno uklanjaju slobodne radikale (Slika 3). U reakciji melatonina i dva donora elektrona, nastaje ciklični 3-hidroksimelatonin (c3OHM), koji i sam ima antioksidativne sposobnosti, kao i N-acetil-N-formil-5-metoksi kinuramin (AFMK) i N-acetil-5-metoksi kinuramin (AMK) koji čine antioksidativnu kaskadu melatonina (Tan i sar., 2014, 2007, 2002). Ova kaskada omogućava jednom molekulu melatonina da za razliku od klasičnih “skavendžera”, neutrališe i više od četiri molekula slobodnih radikala (Tan i sar., 2002).

Sem toga, melatonin ima sposobnost helatizacije aluminijuma, olova, kadmijuma, bakra, gvožđa i cinka (slika 9), pri čemu je interakcija sa ovim metalima zavisna od koncentracije (Reiter i sar., 2016). Značaj sposobnosti melatonina da vezuje metale sa promenljivom valencom kao što su gvožđe i bakar, ogleda se u sprečavanju Fentonove i Haber-Weis-ove reakcije u kojima se stvara hidroksilni radikal.

Od posebnog značaja za antioksidativne efekte melatonina je činjenica da lako prolazi biološke membrane, uključujući i ćelijsku membranu i membranu mitohondrija. Melatonin se koncentriše u mitohondrijama, gde direktno povećavajući stabilnost respiratornog lanca, smanjuje stvaranje superoksidnog anjona i neutrališe štetno dejstvo slobodnih radikala na mestu njihovog stvaranja (Reiter i sar., 2016).

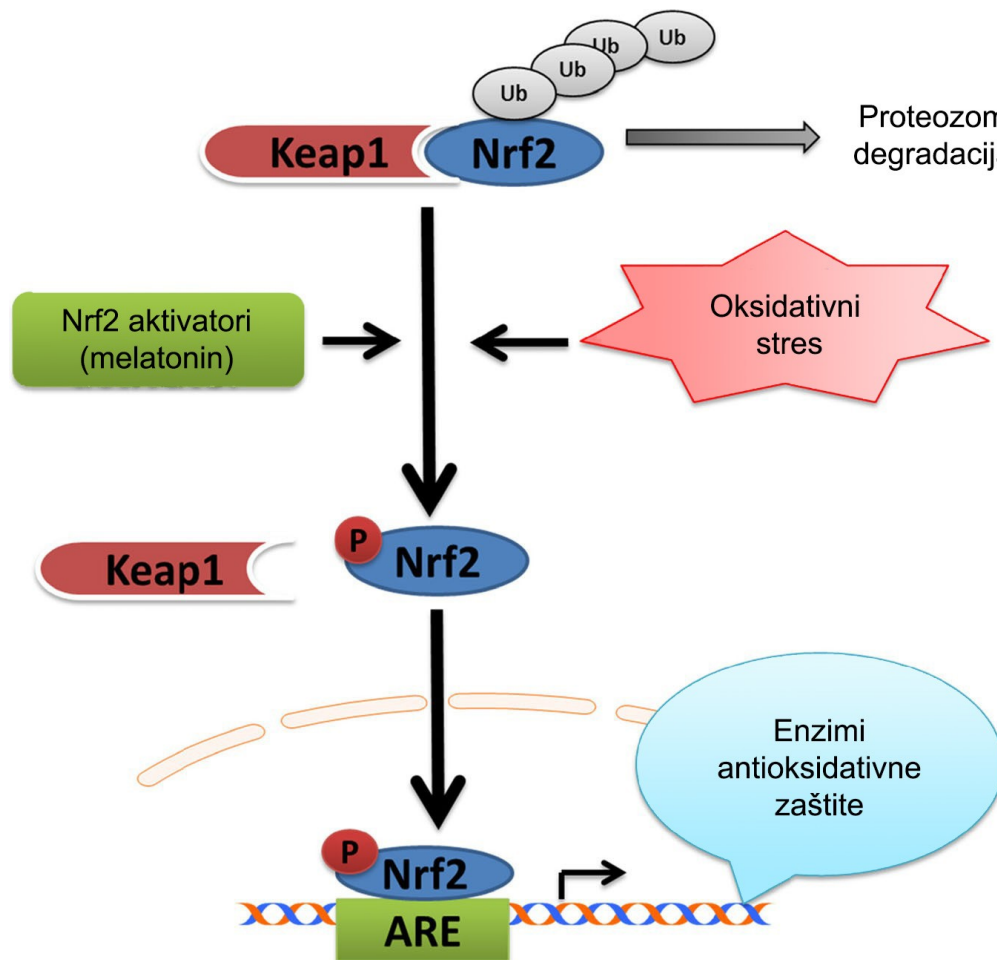
Pored efekta na uklanjanje slobodnih radikala, melatonin stimuliše sintezu i aktivnost antioksidativnih enzima uključujući glutation reduktazu, glutation peroksidazu, katalazu i superoksid dizmutazu (Fischer i sar., 2013; Reiter i sar., 2000). Dodatno melatonin menja odnos redukovanog i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG) u korist redukovane forme, koja ima veliki značaj za antioksidativnu zaštitu (Winiarska i sar., 2006).



Slika 9. Kaskadni proces hemijske transformacije melatonina i njegovih metabolita, koje omogućavaju uklanjanje slobodnih radikala (vertikalno) i helatizaciju metala sa promenljivom valencom (horizontalno) (Reiter i sar., 2016).

Melatonin svoje antioksidativne efekte delimično ostvaruje stimulacijom Nrf2/ARE signalnog puta (slika 10), povećavajući sintezu enzima antioksidativne zaštite (Hristova i sar., 2015). Nrf2 je redoks senzitivni transkripcioni faktor koji je, zbog interakcije sa Kelch ECH asociiranim proteinom 1 (Keap1), u latentnom stanju i aktivira se tek kada povećana koncentracija slobodnih radikala dovede do oksidacije i kovalentne modifikacije Keap1 proteina. Nakon aktivacije koja podrazumeva odvajanje Keap1 proteina i fosforilaciju, Nrf2 prelazi u jedro i vezuje se za element antioksidativnog odgovora (engl. ARE, antioxidant response element) koji inicira

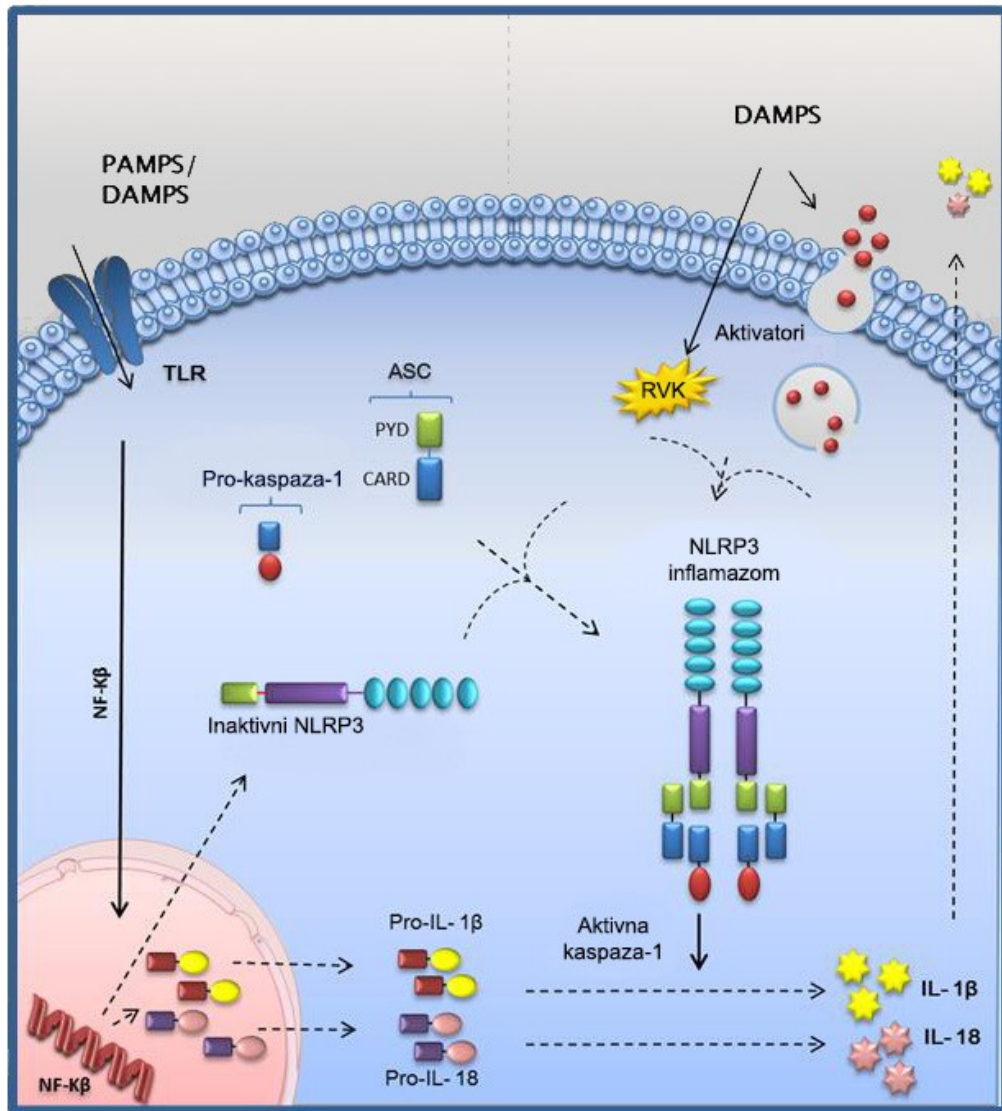
transkripciju gena uključenih u regulaciju sinteze enzima antioksidativne zaštite, hemoksigenaze-1 (HO-1, EC 1.14.99.3), glutamat-cistein ligaze (EC 6.3.2.2), tioredoksin reduktaze (EC 1.8.1.9), glutation S-transferaze (EC 2.5.1.18) i NAD(P)H hinon oksidoreduktaze 1 (NQO1, EC 1.6.5.2) (Deliyanti i sar., 2018).



Slika 10. Šematski prikaz Nrf2/ARE signalnog puta (Zhang i sar., 2014).

Melatonin pored antioksidativnog ispoljava i niz drugih dejstava u organizmu sisara, među kojima je i antiinflamatorno dejstvo (Chuffa i sar., 2017; Hardeland i sar., 2012; Reiter i sar., 2014). Zbog svojih antioksidativnih svojstava, koja ostvaruje direktno ili indirektno stimulacijom Nrf2/ARE (Hristova i sar., 2015), melatonin može da prekine *circulus viciosus* oksidativnog stresa, zbog povećanog stvaranja RVK i inflamacije koja se javlja kao posledica nastalog oksidativnog oštećenja. Sem ovog indirektnog antiinflamatornog efekta, melatonin moduliše NF- κ B signalni put u inflamaciji i na taj način menja transkripciju proinflamatornih gena (Mauriz i sar., 2013;

Reiter i sar., 2014). Inhibirajući NF- κ B signalni put, melatonin smanjuje sintezu citokina i proteina, poput IL-1 β , TNF- α i iNOS, koji su uključeni u nastanak infalamacije u retini (Jiang i sar., 2016).



Slika 11. Aktivacija inflamazoma NLRP3. Aktivni inflamazom NLRP3 nastaje oligomerizacijom inaktivnog NLRP3, ASC proteina i pro-kaspaze-1. Aktivni kompleks aktivira kaspazu-1, koja dalje aktivira IL-1 β i IL-18. Sintezu inaktivnog NLRP3 povećava NF- κ B. Melatonin inhibira sintezu i aktivaciju NLRP3 (Rheinheimer i sar., 2017).

Legenda: PAMPs - molekularni obrasci patogena; DAMPs - molekularni obrasci oštećenja; TLR - "toll-like" receptor; ASC (engl. apoptosis-associated speck-like protein).

Rezultati aktuelnih istraživanja ukazali su na vezu melatonina i inflamazoma NLRP3 (Dong i sar., 2016; García i sar., 2015). Inflamazom NLRP3 (slika 11) je intracelularni multiproteinski kompleks koji posreduje u aktivaciji inflamatornih

kaspaza (kaspaza-1) i indukuje stvaranje proinflamatornih citokina, nakon vezivanja za molekulske obrasce oštećenja (engl. damage-associated molecular patterns, DAMPs). Molekulski obrasci oštećenja u koje spadaju oksidisani LDL, glikozilisani proteini, mokraćna kiselina, ekstracelularni ATP i nukleinske kiseline, vezuju se za receptorski deo ovog kompleksa i dovode do aktivacije kaspaze-1 (Jin i Flavell, 2010; Schroder i sar., 2010). Aktivirana kaspaza-1 vrši proteolitičku transformaciju pro-IL1 β u IL-1 β , koji je prethodno sintetisan stimulacijom NF- κ B signalnog puta (Fernández-Gil i sar., 2017). Interleukin 1 β može potencirati proinflamatorne efekte TNF- α povećavajući ekspresiju receptora za TNF- α na membrani ćelija retine i retinalnih krvnih sudova (Saperstein i sar., 2009).

Povećana aktivacija inflamazoma NLRP3 doprinosi neovakularizaciji u sklopu dijabetesne retinopatije (Chaurasia i sar., 2018), dok je aktivnost ovog inflamazoma povišena u očnoj vodici obolelih od proliferativne dijabetesne retinopatije (Loukovaara i sar., 2017).

Melatonin smanjuje ekspresiju NLRP3, kaspaze-1, IL-1 β , sprečava NLRP3 kompleksom posredovanu apoptozu i smanjuje oštećenje krvno-moždane barijere kod pacova sa subarahnoidalnom hemoragijom (Dong i sar., 2016). Od posebnog je značaja činjenica da melatonin ostvaruje efekat i na NF- κ B signalni put i na NLRP3 inflamazom, ostvarujući sinergistički antiinflamatorni efekat (Favero i sar., 2017). Efekat melatonina na NLRP3 inflamazom je verovatno posredovan ROR- α receptorima (García i sar., 2015).

2. Hipoteza i cilj istraživanja

Iako molekularni mehanizmi nastanka i progresije dijabetesne retinopatije nisu tačno utvrđeni, smatra se da u osnovi bolesti leže metabolička disfunkcija izazvana hiperglikemijom, oksidativni stres, inflamacija i apoptoza u retini, pri čemu se najznačajnijim medijatorom oštećenja krvno-retinalne barijere i neovaskularizacije smatra VEGF. Aktuelna istraživanja ukazala su na značaj stimulacije Nrf2/ARE signalnog puta za terapiju dijabetesne retinopatije.

Melatonin je hormon koji se sintetise u pinealnoj žlezdi i retini. Iako se tradicionalno smatra regulatorom cirkadijarnog ritma kičmenjaka, melatonin je uključen i u regulaciju metabolizma glukoze i sekrecije insulina. Pri tom, njegova koncentracija u krvi može biti značajno snižena u dijabetesu melitusu tip 2. S obzirom na značajne antioksidativne i imunomodulatorne efekte melatonina, kao i činjenicu da se zbog svojih fizio-hemijskih osobina lako transportuje kroz krvno-retinalnu barijeru, pretpostavlja se da suplementacija melatoninom može ostvariti pozitivne efekte na intenzitet oksidativnog stresa u retini, kao i na koncentracije proinflamatornih citokina, adhezivnih molekula i enzima uključenih u patogenezu dijabetesne retinopatije. Od posebnog je značaja činjenica da melatonin antioksidativne efekte delimično ostvaruje stimulacijom Nrf2/ARE signalnog puta.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje efekata melatonina na parametre oksidativnog oštećenja, inflamacije i neoangiogeneze u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2, izazvanim streptozotocin-nikotinamidom.

Konkretni ciljevi predstavljenog naučnog istraživanja su:

1. Određivanje koncentracije glukoze, koncentracije insulina, fruktozamina i lipida u serumu životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom melitusom tip 2, i utvrđivanje efekata oralne suplementacije melatoninom na ispitivane parametre.
2. Utvrđivanje koncentracije TNF- α u serumu životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom melitusom tip 2, i efekata oralne suplementacije melatoninom na njegovu koncentraciju.

3. Utvrđivanje koncentracije melatonina u serumu životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom melitusom tip 2, i efekata oralne suplementacije melatoninom u dozi od 0,2 mg/kg na njegovu koncentraciju.

4. Utvrđivanje intenziteta oksidativnog oštećenja u homogenatu retine životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom melitusom tip 2, ispitivanjem nivoa lipidne peroksidacije (koncentracije TBARS), oksidativne modifikacije proteina (koncentracije AOPP) i koncentracije enzima iNOS.

5. Utvrđivanje koncentracije citokina, adhezivnih molekula i enzima uključenih u procese inflamacije, neoangiogeneze i apoptoze (VEGF, sICAM-1, MMP9, kaspaza-3) u retini životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom melitusom tip 2 kao i efekte oralne suplementacije melatoninom na ispitivane parametre u retini.

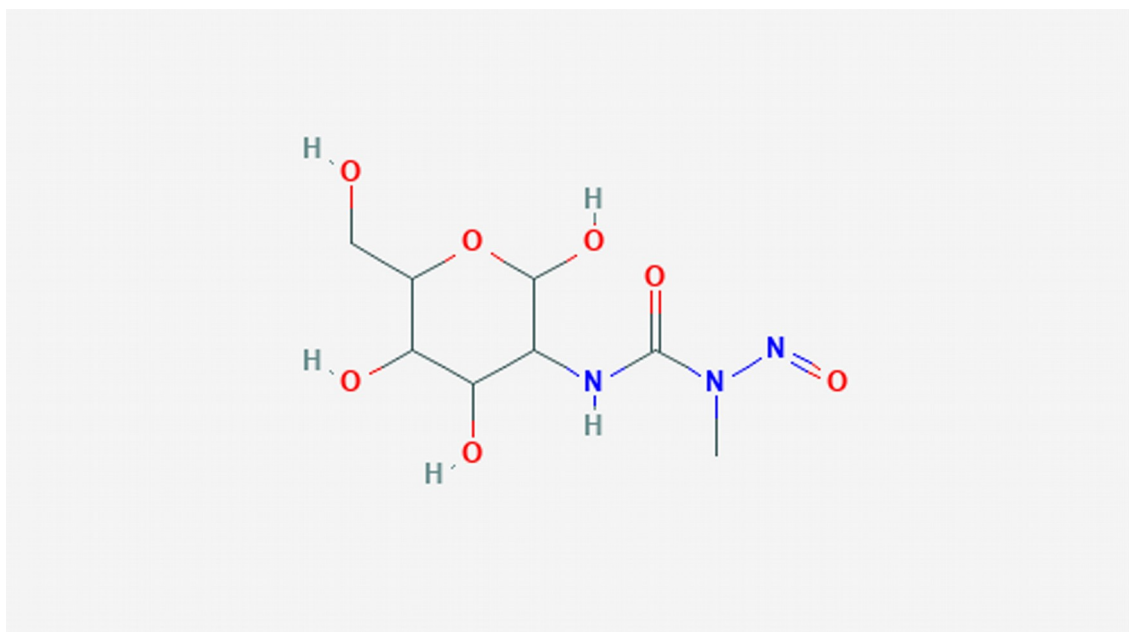
Efekti melatonina su poređeni sa efektima oralnog antidijabetika metformina, standardnog terapijskog agensa u dijabetesu melitusu tip 2.

3. Materijal i metode

3.1. Hemijske supstance

3.1.1. Streptozotocin

Streptozotocin (slika 12) korišćen za potrebe istraživanja, u cilju izazivanja dijabetesa melitusa tip 2 bio je visokog stepena čistoće, $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). Prema uputstvu proizvođača rastvaran je u svežem, ledeno hladnom citratnom puferu (0,1 mol/L; pH 4,5).



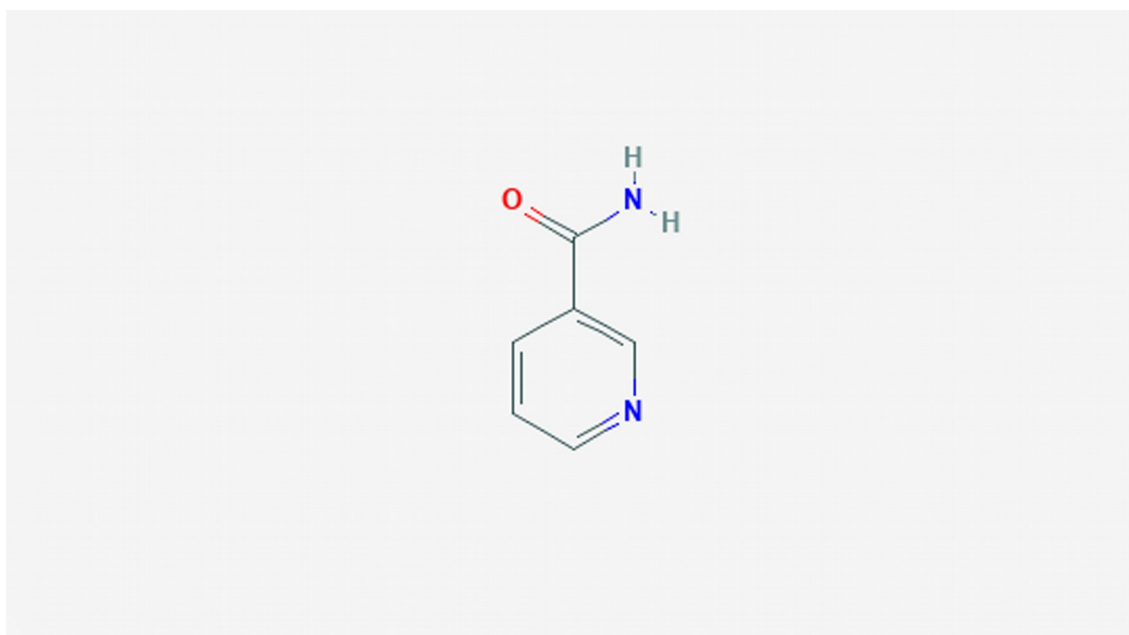
Slika 12. Hemijska struktura molekula streptozotocina (National Center for Biotechnology Information - PubChem Compound Database, 2019)

Streptozotocin (glukozamin-nitrozourea) je toksični analog glukoze koji u β -ćelije endokrinog pankreasa ulazi posredstvom glukoznog transportera tip 2 (GLUT2) i nakon spontanog raspada praćenog oslobađanjem metil karbokatjona izaziva alkilaciju DNK. Oštećenje DNK izaziva poli-ADP ribozilaciju, koja brzo dovodi do pada koncentracije intracelularnog NAD⁺ i ATP-a. Ubrzana defosforilacija ATP-a proizvodi supstrat za enzim ksantin oksidazu, čija aktivnost dalje rezultuje stvaranjem superoksid anjon radikala koji se dalje može transformisati u vodonik-peroksid ili hidroksilni radikal. Streptozotocin oslobađa toksične koncentracije NO što dovodi do inhibiranja

akonitaze i dodatno remeti energetski metabolizam u ćelijama. Kao krajnji efekat narušavanja energetskog metabolizma i oksidativnog oštećenja usled stvaranja slobodnih radikala, β -ćelije endokrinog pankreasa izložene dejstvu streptozotocina ulaze u proces nekroze (Szkudelski, 2012, 2001).

3.1.2. Nikotinamid

Nikoinamid (slika 13) korišćen za potrebe eksperimenta u cilju ublažavanja oštećenja nastalih dejstvom streptozotocina bio je visokog stepena čistoće, $\geq 99,5\%$ (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany).

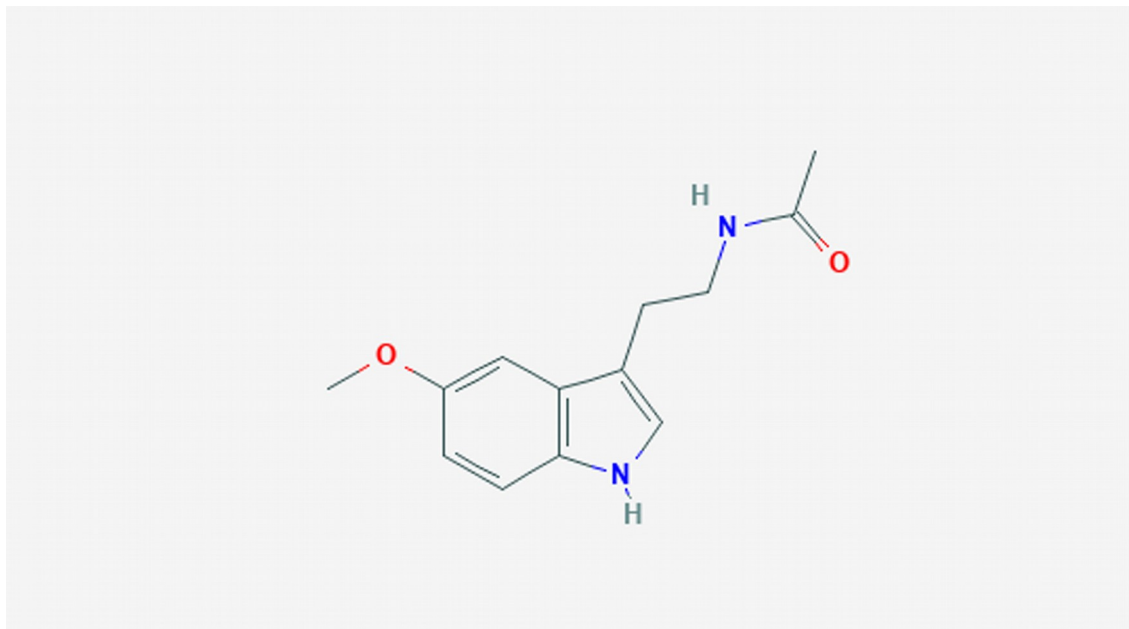


Slika 13. Hemijska struktura molekula nikotinamida (National Center for Biotechnology Information - PubChem Compound Database, 2019)

Nikotinamid je amidni derivat niacina i aktivna komponenta koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP). Nikotinamid je inhibitor enzima poli-ADP ribozil polimeraze (PARP) i sprečava pad intracelularnog NAD⁺-a i ATP-a uzrokovan dejstvom ovog enzima. Sa druge strane nikotinamid je i prekursor za sintezu NAD⁺-a i na taj način dodatno može povećati njegovu koncentraciju u ćeliji (Szkudelski, 2012). Zbog toga nikotinamid ima protektivno dejstvo na β -ćelije endokrinog pankreasa izložene dejstvu streptozotocina.

3.1.3. Melatonin

Melatonin (slika 14) korišćen za potrebe eksperimenta je bio visokog stepena čistoće, $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). Prema uputstvu proizvođača rastvaran je u apsolutnom etanolu i nakon toga dodavan u vodu (0,01%).



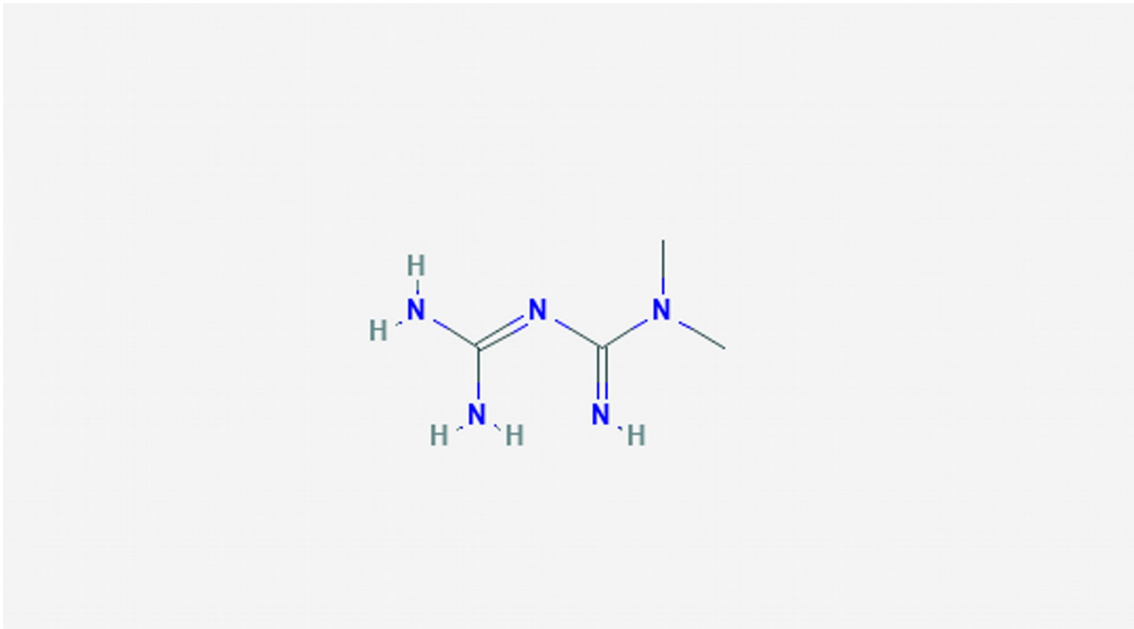
Slika 14. Hemijska struktura molekula melatonina (National Center for Biotechnology Information - PubChem Compound Database, 2019)

3.1.4. Metformin

Metformin (slika 15) korišćen za potrebe eksperimenta je bio visokog stepena čistoće, $\geq 97\%$ (Merck, Darmstadt, Germany). Prema uputstvu proizvođača rastvaran je u vodi.

Metformin je lek iz grupe bigvanida koji predstavlja lek izbora kod obolelih od dijabetesa tipa 2. Ovaj lek izveden je iz galagina, izolovanog iz biljke piskavice (lat. *Galega officinalis*). U pitanju je lek sa kompleksnim i mnogostrukim mehanizmima delovanja. Metformin inhibira glukoneogenezu u jetri, dok u crevima povećava korišćenje glukoze i stimuliše sekreciju glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) (Rena i sar., 2017). Na molekularnom nivou metformin inhibira mitohondrijalnu glicerofosfat dehidrogenazu (mGPD) i na taj način smanjuje konverziju laktata i glicerola u glukozu

(Madiraju i sar., 2014). Samo povećanje redoks stanja u citozolu posredovano metforminom dovodi do inhibicije glukoneogeneze (Madiraju i sar., 2018). Fosforilacijom posredstvom AMP aktivisane protein kinaze (AMPK) koja za posledicu ima inhibiciju acetil-CoA karboksilaze, metformin inhibira sintezu i stimuliše razgradnju masti u jetri (Fullerton i sar., 2013). Odgovor na metformin pored primenjene doze, zavisi i od dužine terapije (Rena i sar., 2017).



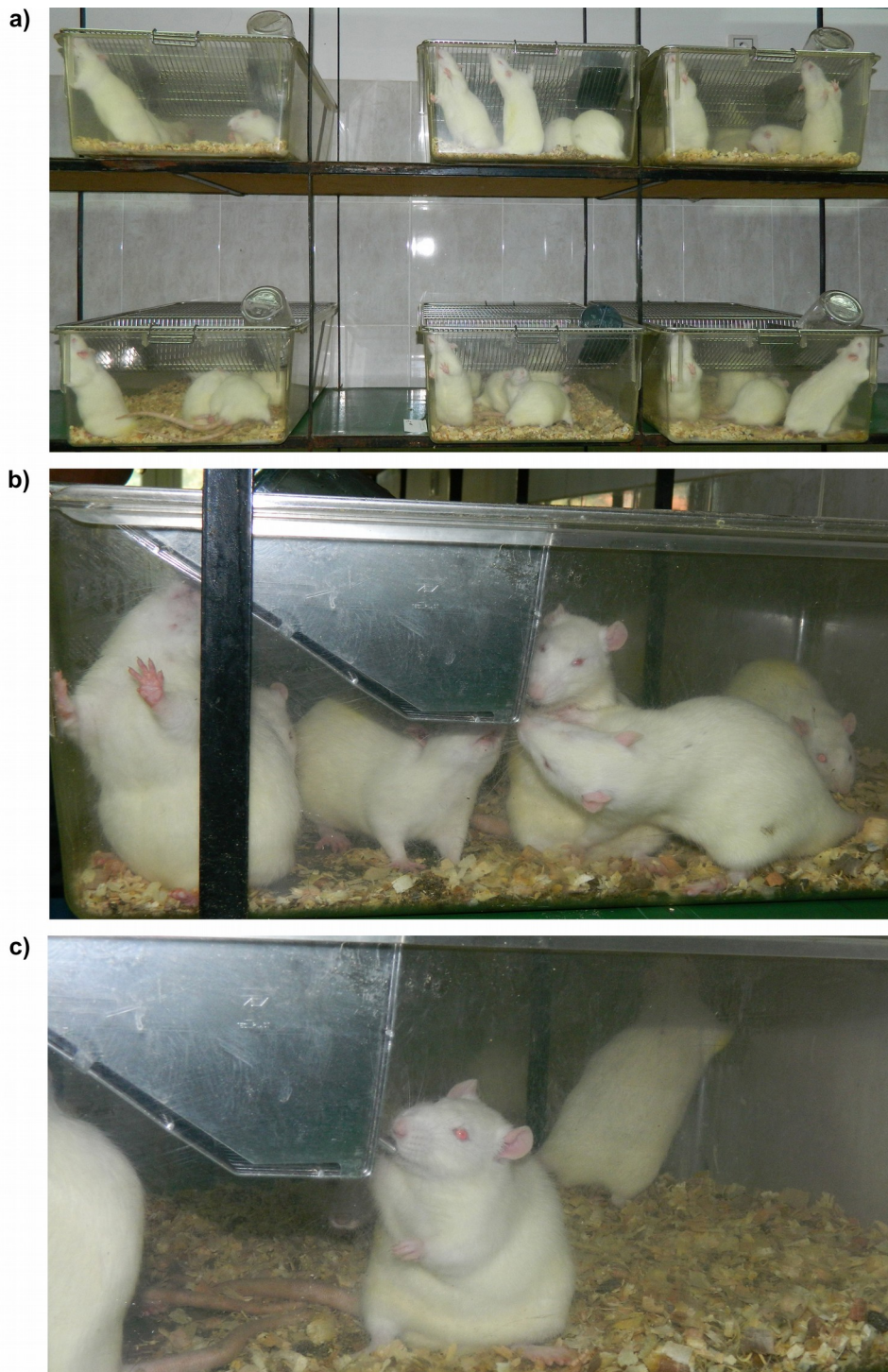
Slika 15. Hemijska struktura molekula metformina (National Center for Biotechnology Information - PubChem Compound Database, 2019)

3.2. Eksperimentalne životinje

Eksperiment je izveden na ukupno 51-om albino pacovu Vistar (engl. Wistar) soja, muškog pola, starosti deset nedelja. Sve životinje su bile zdrave i na početku eksperimenta težile su od 230 do 250 g. Životinje su uzgojene u vivarijumu Naučno-istraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, gde su i bile smeštene za vreme trajanja eksperimenta.

Životinje su bile smeštene u plastičnim kavezima (slika 16), u klimatizovanoj prostoriji sa kontrolisanim uslovima (temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost vazduha 55%) i veštačkim osvetljenjem (arteficijalni 12-časovni svetlost/tama ciklus). Za vreme trajanja eksperimenta sve eksperimentalne grupe su imale neograničen pristup

hrani i vodi za piće. Sve grupe su konzumirale standardnu hranu za pacove koja je sadržala 11 kJ/g metaboličke energije (20% proteina, 4% masti, 40% ugljenih hidrata, 8% sirovih vlakana).



Slika 16. Eksperimentalne životinje za vreme trajanja eksperimenta, a) životinje smeštene u plastičnim kavezima; b) i c) životinje piju vodu u kojoj su rastvoreni melatonin/metformin.

3.3. Etički principi u radu sa eksperimentalnim životinjama

Eksperiment je osmišljen u skladu sa principima ARRIVE (engl. Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) i ARVO (engl. The Association for Research in Vision and Ophthalmology: The use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) vodiča i izveden uz striktno poštovanje principa EU direktive 2010/63/EU za eksperimente na životinjama, Vodiča za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja NIH (engl. National Institute of Health, 1978) i Pravilnika za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Eksperimentalni protokol je odobren od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu (broj dozvole 01-10204-3).

3.4. Eksperimentalni model i eksperimentalne grupe

Životinje su podeljene u šest eksperimentalnih grupa (I, II, III, IV, V, VI). Svaku grupu činilo je 7 jedinki (slika 17). Za proračun veličine uzorka uzete su prosečne vrednosti i standardne devijacije dobijene u pilot studiji (N=14), koja je prethodila opisanom istraživanju i koja je sprovedena u cilju pripreme koncepta opisanog istraživanja. Veličina efekta pilot studije bila je $ES=0,61$. Izračunavanje veličine uzorka je izvršeno u softverskom paketu G-Power. Za *a priori* proračun veličine uzorka odabrano je testiranje nulte hipoteze jednostrukom analizom varijanse (one way ANOVA) uz prihvaćene vrednosti verovatnoće greške prvog tipa $\alpha=0,05$ i snage studije 0,8. Predviđena veličina ukupnog uzorka predloženog istraživanja približno je 42, odnosno 7 jedinki po grupi.

3.4.1. Animalni model dijabetesa melitusa tip 2

Nakon aklimatizacije u trajanju od 7 dana, dijabetes melitus tip 2 izazvan je kod eksperimentalnih životinja iz grupa IV, V i VI (slika 17). U cilju izazivanja dijabetesa melitusa tip 2 primenjena je modifikacija metode prethodno opisane od strane Masiello-a i sar. (Masiello i sar., 1998; Szkudelski, 2012).

Dijabetes melitus tip 2 kod eksperimentalnih životinja (grupe IV, V, VI) izazvan je intraperitonealnim aplikovanjem svežeg rastvora streptozotocina u dozi od 45 mg/kg telesne mase, nakon intraperitonealne injekcije nikotinamida u dozi od 110 mg/kg telesne mase u fiziološkom rastvoru, nakon noćnog gladovanja. Simultano, životinje iz grupa I, II i III dobile su intraperitonealne injekcije citratnog pufera i fiziološkog rastvora.

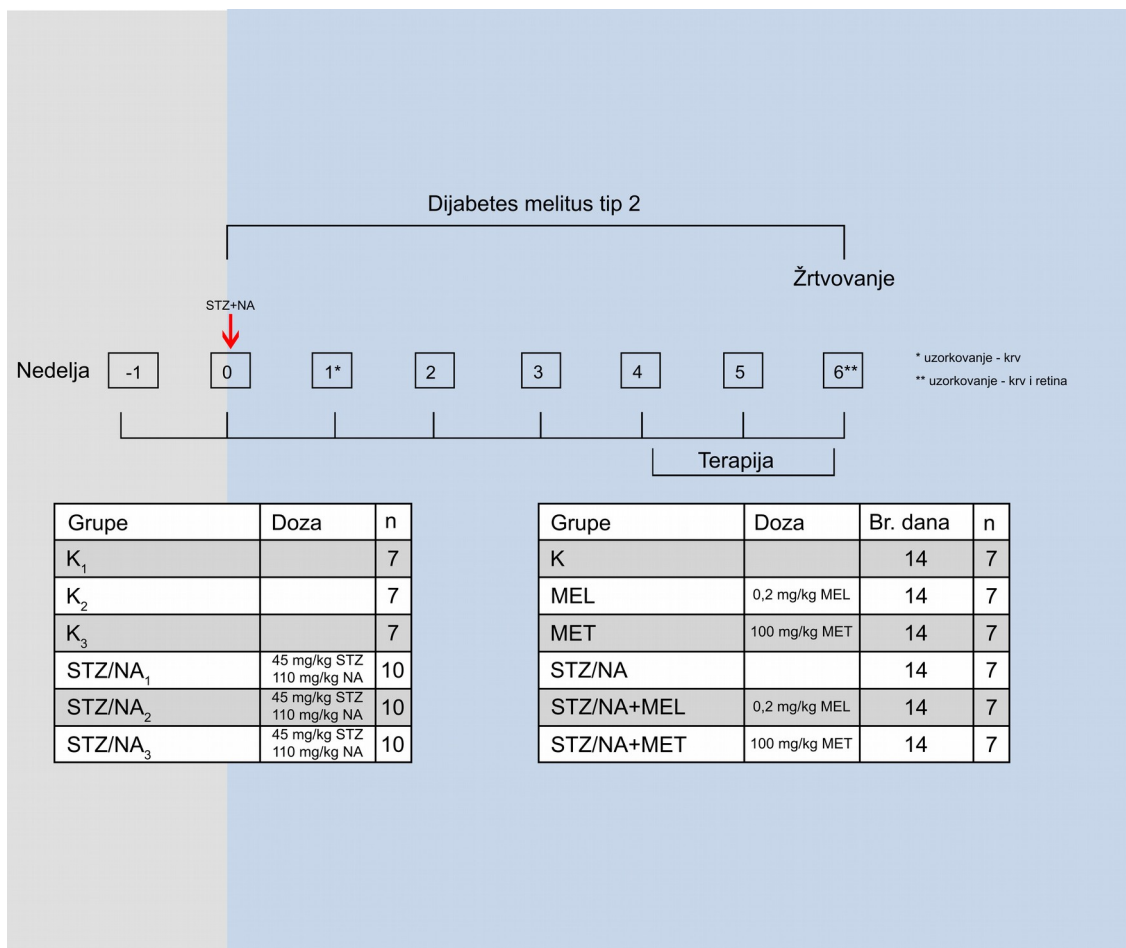
Uspešnost razvoja modela dijabetesa melitusa tip 2 izazvanog aplikovanjem streptozotocina i nikotinamida kod eksperimentalnih životinja utvrđena je na osnovu izmerene koncentracije glukoze u venskoj krvi. Uzorci krvi za analizu uzimani su 3. i 7. dana nakon aplikovanja streptozotocina i nikotinamida, nakon 2-časovnog i 8-časovnog gladovanja. Koncentracija glukoze u krvi je određivana pomoću automatizovanog merača Accu-check Performa (Roche Diagnostics, USA), u cilju potvrde postojanja hiperglikemije. Krv je uzorkovana iz repne vene, pomoću leptir igle, bez primene anestezije. Granične vrednosti glikemije posle 2- i 8-časovnog gladovanja bile su $> 8,3$ mmol/l i $> 6,1$ mmol/l.

3.4.2. Tretman melatoninom i metforminom

Četiri nedelje nakon aplikacije streptozotocina i nikotinamida, kada je model u potpunosti razvijen, započet je tretman melatoninom i metforminom u odgovarajućim grupama u trajanju od 2 nedelje (slika 17).

Melatonin je aplikovan oralno, u pijaćoj vodi. Koncentracija melatonina u vodi bila je 2 μ g/ml, pri čemu je dnevna doza melatonina iznosila 85 μ g po životinji, što odgovara dozi od 0,2 mg/kg telesne mase (Montilla i sar., 1998). Melatonin je najpre rastvaran u maloj količini apsolutnog etanola, a zatim je etanolni rastvor melatonina dodavan u pijaću vodu (0,01%). Boce sa melatoninom su pokrivane aluminijumskom folijom, zbog fotosenzitivnosti melatonina. Melatoninom su tretirane grupe II i V.

Metformin je aplikovan oralno, u pijaćoj vodi. Koncentracija metformina u vodi bila je 1 mg/ml, pri čemu je dnevna doza metformina iznosila 41 mg po životinji, što odgovara dozi od 100 mg/kg telesne mase (Choi i sar., 2006; Mostafa i sar., 2016). Metforminom su tretirane grupe III i VI.



Slika 17. Šematski prikaz eksperimentalnog protokola.

*Uzorkovanje krvi u 1. nedelji obavljeno je u cilju potvrde hiperglikemije, odnosno provere uspešnosti razvoja animalnog modela dijabetesa melitusa tipa 2. Uzorak je dobijen iz repne vene.

** Uzorkovanje krvi i retine na kraju 6. nedelje pri žrtvovanju obavljeno je u cilju pripreme uzoraka za dalju analizu. Uzorak krvi dobijen je punkcijom srca.

3.4.3. Pregled grupa eksperimentalnih životinja

I (**K**) – kontrolna grupa

II (**MEL**) – kontrolna grupa tretirana melatoninom

III (**MET**) – kontrolna grupa tretirana metforminom

IV (**STZ/NA**) – grupa sa dijabetesom melitusom tip 2

V (**STZ/NA+MEL**) – grupa sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirana melatoninom

VI (**STZ/NA+MET**) – grupa sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirana metforminom

3.5. Eksperimentalni protokol

Nakon dve nedelje tretmana melatoninom/metforminom, životinje su žrtvovane eksangvinacijom nakon bilateralne torakotomije u dubokoj anesteziji (Ketamidol, Richter Pharma AG; 100 mg/kg, ip). Pre žrtvovanja, životinjama je određena koncentracija glukoze u krvi, pod istim uslovima kao i na početku eksperimenta i to posle 2 i 8 sati gladovanja.

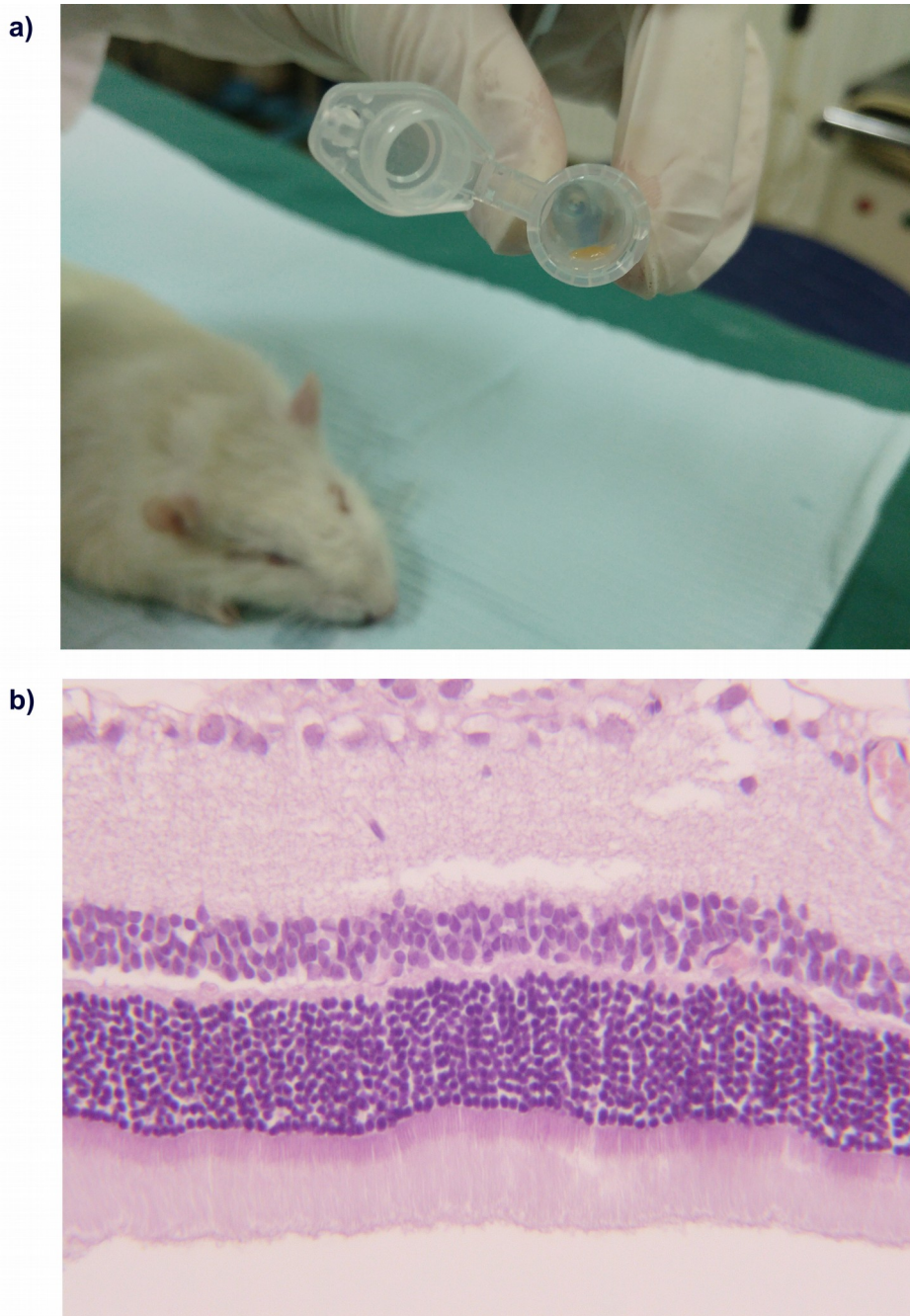
Unos hrane i vode, koja je bila dostupna *ad libitum*, je praćen svakodnevno.

Telesna masa životinja je kontinuirano praćena, pri čemu su merenja obavljena jednom nedeljno u razmaku od 7 dana (na početku 2, 4, 5. i 6. nedelje), kao i na dan žrtvovanja. Životinje su merene na vagi, nakon noćnog gladovanja. Telesna masa upotrebljena je za računanje indeksa specifičnog porasta telesne mase $(g/kg)=\Delta M/M$, gde ΔM predstavlja porast telesne mase u intervalu $d_t=t_2-t_1$ i M telesnu masu u trenutku t_1 .

3.6. Priprema uzoraka

Krv je uzorkovana terminalnom punkcijom srca. Serum i plazma su izdvojeni centrifugiranjem (15 minuta na $3000 \times g$) na $+4^\circ C$ u Eppendorf 5415R centrifugi i čuvani na $-20^\circ C$. Na-EDTA je korišćen kao antikoagulans.

Uzorci retine oba oka (slika 18), uzeti su odvajanjem sa zadnjeg unutrašnjeg zida očne jabučice, nakon presecanja očne jabučice u predelu rožnjače i uklanjanja sočiva i staklastog tela (Skeie i sar., 2011). Uzorci su izmereni na analitičkoj vagi i nakon toga homogenizovani u ledenoj destilovanoj vodi upotrebom mini homogenizatora (Homogenisator Mixy Mini cordless grinder, Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) direktno u mikro tubama. Pripremljeni homogenati, su zatim centrifugirani u cilju izdvajanja supernatanta (20 minuta na $3000 \times g$) na $+4^\circ C$ u Eppendorf 5415R centrifugi. Homogenati su čuvani na $-80^\circ C$, do obavljanja biohemijskih analiza.



Slika 18. a) Uzorkovana retina u mikro tubi; b) Histološka građa retine pacova iz kontrolne grupe (hematoksilin-eozin bojenje, x20).

3.7. Metode

3.7.1 Određivanje koncentracije glukoze u serumu

Koncentracija glukoze u serumu određivana je upotrebom metode heksokinaza/ glukoza-6-fosfat dehidrogenaza na automatskom kliničkom hemijskom analizatoru

(Dimension RxL Max, Dade Behring Siemens, Marburg, Germany) uz upotrebu originalnih reagenasa (Siemens Healthcare Diagnostics).

3.7.2. Određivanje koncentracije fruktozamina u serumu

Koncentracija fruktozamina (nastalog glikacijom serum albumina) određivana je pomoću spektrofotometrijske metode Baker-a i sar. (1994, 1985). Fruktozamin je jedinjenje koje nastaje u reakciji glukoze i primarnog amina, što je praćeno izomerizacijom i nastajanjem Amadori proizvoda. U alkalnoj sredini (natrijum karbonatni pufer, pH 10,35) na 37°C, raspadom Amadori proizvoda nastaje D-glukazon koji redukuje nitro plavo tetrazolijum (NBT) u purpurni monoformazan. Intenzitet boje se čita na $\lambda = 530$ nm, a vrednosti se izražavaju u mol/l.

3.7.3. Određivanje koncentracije insulina u serumu

Koncentracija insulina u serumu određivana je enzimskim imunoesejem (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), u skladu sa uputstvom proizvođača (Mercodia Rat Insulin ELISA, Upssala, Sweden; kataloški broj 10-1250-01). Procedura određivanja koncentracije insulina u serumu zasniva se na direktnoj sendvič tehnici uz upotrebu dva monoklonska antitela specifična za različite antigene determinante molekula insulina pacova. Za vreme inkubacije, insulin iz uzorka reaguje sa anti-insulinskim antitelom vezanim za dno bunarića u mikrotitracionoj ploči i sa antiinsulinskim antitelom konjugovanim sa enzimom peroksidaza rena (engl. horseradish peroxidase-HRP) koje se detektuje reakcijom sa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinom (TMB). Reakcija se zatim prekida dodavanjem kiseline i intenzitet boje se očitava spektrofotometrijski.

Rastvori (HRP konjugovano monoklonsko anti-insulin antitelo i pufer za ispiranje) su pripremani prema uputstvu proizvođača. U odgovarajuće bunariće mikrotitracione ploče obložene antitelom na insulin dodavani su standardi i ispitivani uzorci seruma u zapremini od 10 μ l u duplikatu. U bunariće je zatim dodavano po 50 μ l rastvora enzimskog konjugata (HRP konjugovano anti-insulinsko antitelo). Nakon

inkubacije u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi, mikrotitraciona ploča je ispirana puferom za ispiranje na automatskom ispiraju mikrotitracionih ploča. Nakon poslednjeg ispiranja dodavano je po 200 μ l substrata (TMB) u svaki bunarić. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 μ l stop rastvora nakon inkubacije od 15 min nakon čega je na plejt čitaču merena apsorbancija na 450 nm. Na osnovu apsorbancije standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija insulina u uzorcima. Koncentracija insulina u ispitivanim uzorcima je izražena u pmol/l.

3.7.4. Određivanje kvantitativnog indeksa insulinske senzitivnosti

Kvantitativni indeks insulinske senzitivnosti (QUICKI) je određivan u cilju procene insulinske rezistencije, po formuli: $QUICKI = 1 / (\log(\text{insulin našte } \mu\text{U/ml}) + \log(\text{glukoza našte mg/dl}))$.

3.7.5. Određivanje koncentracije triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola u serumu eksperimentalnih životinja

Koncentracije ukupnog holesterola, HDL holesterola i triglicerida su merene enzimskim metodama na automatskom kliničkom hemijskom analizatoru (Dimension RxL Max, Dade Behring Siemens, Marburg, Germany) uz upotrebu originalnih reagenasa (Siemens Healthcare Diagnostics).

Koncentracija LDL holesterola je računata po Fridvaldovoj formuli: $LDL = \text{ukupni holesterol} - \text{HDL} - [\text{trigliceridi}/2,2]$. Koncentracije serumskih lipida izražene su u mmol/l.

3.7.6. Određivanje koncentracije faktora nekroze tumora- α u serumu

Koncentracija TNF- α u serumu određivana je enzimskim imunoesejem (ELISA) u skladu sa uputstvom proizvođača (Rat TNF- α ELISA Kit, Abcam Cambridge, UK; kataloški broj ab46070). Procedura određivanja koncentracije TNF- α u serumu zasniva se na sendvič tehnici uz upotrebu dva monoklonska antitela specifična za TNF- α .

(hvatajuće i detektujuće). Detektujuće antitelo je biotinizovano monoklonsko antitelo koje pored TNF- α vezuje i streptavidinom obeležen enzimski konjugat (Streptavidin-HRP). Za vreme prve inkubacije, TNF- α iz uzorka se veže sa hvatajućim antitelom vezanim za dno bunarića u mikrotitracionoj ploči i sa biotinizovanim antitelom. Nakon ispiranja dodaje se enzimski konjugat (Streptavidin-HRP) koji se za vreme druge inkubacije veže za hvatajuće antitelo. Detekcija TNF- α omogućena je reakcijom HRP sa supstratom TMB. Reakcija se zatim prekida dodavanjem kiseline i intenzitet boje se očitava spektrofotometrijski.

Reagensi (biotinizovano anti-TNF- α antitelo, streptavidin-HRP enzimski konjugat i pufer za ispiranje) i rastvori standarda su pripremani prema uputstvu proizvođača. U odgovarajuće bunariće mikrotitracione ploče obložene antitelom na TNF- α dodavani su standardi pripremljeni po uputstvu i ispitivani uzorci seruma u zapremini od 100 μ l u duplikatu. U bunariće je zatim dodavano po 50 μ l rastvora biotinizovanog anti-TNF- α antitela. Nakon inkubacije u trajanju od 3 sata na sobnoj temperaturi i ispiranja puferom za ispiranje na automatskom ispiraču mikrotitracionih ploča, u bunariće je dodavano po 100 μ l rastvora enzimskog konjugata (Streptavidin-HRP). Nakon inkubacije u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi, mikrotitraciona ploča je ponovo ispirana puferom za ispiranje na automatskom ispiraču mikrotitracionih ploča. Nakon poslednjeg ispiranja dodavano je po 100 μ l substrata (TMB) u svaki bunarić. Nakon inkubacije od 20 minuta u tami reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 μ l stop rastvora nakon čega je na plejt čitaču merena apsorbancija na 450 nm. Na osnovu apsorbancija standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija TNF- α u uzorcima. Koncentracija TNF- α u ispitivanim uzorcima je izražena u pmol/l.

3.7.7. Određivanje koncentracije melatonina u serumu

Serumski melatonin je meren metodom tečne hromatografije visokih performansi (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) nakon čvrsto-tečne ekstrakcije (engl. Solid Phase Extraction – SPE), primenom neznatno modifikovane metode Ozkan-a i sar. (2011).

Za hromatografsku analizu korišćeni su metanol i acetonitril HPLC stepena čistoće (J. T. Baker, Avantor, Deventer, The Netherlands). Osnovni rastvor standarda melatonina (1 mg/ml) je pripremljen u metanolu i čuvan na -20°C. Radni rastvori standarda melatonina željenih koncentracija su pripremani svakodnevno.

Postupak čvrsto-tečne ekstrakcije izvođen je pomoću kertridža Oasis HLB (1 cc, 30 mg; Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). Kondicioniranje je izvršeno propuštanjem najpre 1 ml metanola, a zatim 1 ml vode kroz kertridž radi njegove aktivacije. Zatim je 1 ml razblaženog seruma (0.5 ml seruma sa 0.5 ml vode) propušten kroz kolonu radi vezivanja komponenti matriksa za sorbens, nakon čega je uzorak ispran pomoću 1 ml 10% rastvora metanola u vodi u cilju uklanjanja komponenti matriksa, pri čemu je analit (melatonin) ostao vezan za sorbens. Eluiranje je izvedeno pomoću 0,5 ml metanola. Eluat je evaporisan pomoću azota, a suvi ostatak je rekonstituisan u 100 µl početne mobilne faze. Dvadeset mikrolitara pripremljenog uzorka je zatim ubrizgavano u HPLC sistem.

Hromatografska analiza je obavljena na tečnom hromatografu Agilent HPLC 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) opremljenim fluorescentnim detektorom ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 345 \text{ nm}$; PMT je bio 14 između 5,5 i 7,5 minuta).

Melatonin je izdvojen na analitičkoj koloni Zorbax Eclipse AAA, 4,6 x 150 mm i.d., 3,5 µm veličine čestica (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) na 30°C upotrebom gradijentne elucije. Hromatografska mobilna faza sastojala se od vode (komponenta A) i acetonitrila (komponenta B) i propušтана je pri protoku od 1,5 ml/min. Retenciono vreme melatonina je bilo 6,5 minuta. Koncentracija melatonina izražena je u pg/ml.

3.7.8. Određivanje koncentracije tiobarbiturat reagujućih supstanci u homogenatu retine

Koncentracija tiobarbiturat reagujućih supstanci (TBARS) u retini je određivana spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. (1988). Metoda se bazira na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom, na visokoj temperaturi (95°C) i u kiseloj sredini, pri čemu nastaje hromogen (MDA-TBA2), čiji se intenzitet boje čita na $\lambda = 532 \text{ nm}$. Koncentracija TBARS izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog

koeficijenta koji iznosi $1,54 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i izražava se $\mu\text{mol/l}$, a zatim preračunava na mg proteina.

3.7.9. Određivanje koncentracije proizvoda uznapredovale oksidacije proteina u homogenatu retine

Koncentracija proizvoda uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) je određivana spektrofotometrijskom metodom po Witko-Sarsat-u i sar. (1996). Kalibracija je izvršena rastvorima hloramina-T, koji u prisustvu kalijum-jodida apsorbuje svetlost na $\lambda = 340\text{nm}$. Koncentracije AOPP-a su izražene u $\mu\text{mol/l}$ hloramin-T ekvivalenata, a zatim preračunate na mg proteina.

3.7.10. Određivanje koncentracije inducibilne azot-monoksid sintaze u homogenatu retine

Koncentracija iNOS u homogenatu retine određivana je enzimskim imunoesejem (ELISA), u skladu sa uputstvom proizvođača (Rat Inducible Nitric Oxide Synthase ELISA Kit, Cusabio, College Park, US; kataloški broj CSB-E08325r).

Procedura određivanja koncentracije iNOS zasniva se na kvantitativnoj sendvič tehnici uz upotrebu dva monoklonska antitela specifična za iNOS (hvatajuće i detektujuće). Hvatajuće antitelo je vezano za dno bunarića mikrotitracione ploče. Detektujuće antitelo je biotinizovano monoklonsko antitelo koje pored iNOS vezuje i avidinom obeležen enzimski konjugat (Avidin-HRP). Za vreme prve inkubacije, iNOS iz uzorka se veže sa hvatajućim antitelom vezanim za dno bunarića u mikrotitracionoj ploči i biotinizovanim antitelom. Nakon ispiranja dodaje se enzimski konjugat (Avidin-HRP) koji se za vreme druge inkubacije veže za detektorsko antitelo. Detekcija proteina iNOS omogućena je reakcijom HRP sa supstratom TMB. Reakcija se zatim prekida dodavanjem kiseline i intenzitet boje se očitava spektrofotometrijski. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji iNOS u prvom koraku.

Reagensi (biotinizirano anti-iNOS antitelo, avidin-HRP enzimski konjugat i pufer za ispiranje) i rastvori standarda su pripremani prema uputstvu proizvođača. U odgovarajuće bunariće mikrotitracione ploče obložene antitelom na iNOS dodavani su

standardi pripremljeni po uputstvu i ispitivani uzorci u zapremini od 100 μ l. Nakon inkubacije u trajanju od 2 sata na 37°C i uklanjanja tečnosti iz bunarića mikrotitracione ploče bez pranja, u bunariće je dodavano po 100 μ l rastvora biotinizovanog anti-iNOS antitela. Nakon inkubacije u trajanju od 1 sata na 37°C i ispiranja puferom u bunariće je dodavano po 100 μ l rastvora enzimskog konjugata (avidin-HRP). Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na 37°C i ispiranja dodavano je po 90 μ l substrata (TMB) u svaki bunarić. Nakon inkubacije od 20 minuta u tami, reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 μ l stop rastvora nakon čega je na plejt čitaču merena apsorbancija na 450nm. Na osnovu apsorbancija standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija iNOS u uzorcima. Koncentracija iNOS u ispitivanim uzorcima je preračunata u IU/ml, a zatim izražena na mg proteina.

3.7.11. Određivanje koncentracije vaskularnog endotelnog faktora rasta u homogenatu retine

Koncentracija VEGF u homogenatu retine određivana je enzimskim imunoesejem (ELISA) u skladu sa uputstvom proizvođača (Quantikine ELISA Rat VEGF, R&DSYSTEMS, Minneapolis, US; kataloški broj RRV00). Procedura određivanja koncentracije VEGF zasniva se na kvantitativnoj sendvič imunoenzimskoj tehnici uz upotrebu dva antitela specifična za VEGF (hvatajuće i detektujuće). Hvatajuće monoklonsko antitelo je vezano za dno bunarića mikrotitracione ploče. Detektujuće poliklonsko antitelo je konjugovano sa peroksidazom iz rena (HRP). Enzim peroksidaza rena detektuje se reakcijom sa supstratom TMB pri čemu se javlja plava boja. Reakcija se zatim prekida dodavanjem kiseline, pri čemu se plava boja menja u žutu i intenzitet boje se očitava spektrofotometrijski. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji VEGF u prvom koraku.

Reagensi (konjugovano anti-VEGF antitelo, pufer za ispiranje) i rastvori standarda su pripremani prema uputstvu proizvođača. U odgovarajuće bunariće mikrotitracione ploče obložene antitelom na VEGF dodavani su standardi pripremljeni po uputstvu i ispitivani uzorci u zapremini od 50 μ l. Nakon inkubacije u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi i ispiranja na automatskom ispirajućem mikrotitracionom ispirajućem puferu, u bunariće je dodavano po 100 μ l anti-VEGF konjugata. Nakon inkubacije u trajanju od 1

sata na sobnoj temperaturi i ispiranja u bunariće je dodavano po 100 µl substrata (TMB). Nakon inkubacije od 30 minuta u tami reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µl stop rastvora nakon čega je na plejt čitaču merena apsorbanca na 450 nm. Na osnovu apsorbanci standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija VEGF u uzorcima. Koncentracija VEGF u ispitivanim uzorcima je preračunata u pg/ml, a zatim izražena na mg proteina.

3.7.12. Određivanje koncentracije solubilnog intercelularnog adhezionog molekula 1 u homogenatu retine

Koncentracija sICAM u serumu merena je pomoću komercijalnog ELISA kita, uz upotrebu sICAM pacova kao standarda (Quantikine ELISA Rat sICAM/CD54, R&D Systems, Minneapolis, US; kataloški broj RIC100). Princip, kao i procedura eseja zasnivaju se na kvantitativnoj sendvič imunoenzimskoj tehnici uz upotrebu dva antitela specifična za sICAM (hvatajuće i detektujuće) i identični su principu i proceduri opisanim za ELISA kit za određivanje koncentracije sICAM istog proizvođača. Apsorbanca je merena na plejt čitaču na 450 nm. Na osnovu apsorbanci standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija sICAM u uzorcima. Koncentracija je preračunata u ng/ml, a zatim izražena na mg proteina.

3.7.13. Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze 9 u homogenatu retine

Koncentracija MMP-9 u serumu merena je pomoću komercijalnog ELISA kita, uz upotrebu MMP-9 pacova kao standarda (Quantikine ELISA Rat MMP-9, R&D Systems, Minneapolis, US; kataloški broj RMP900). Princip, kao i procedura eseja zasnivaju se na kvantitativnoj sendvič imunoenzimskoj tehnici uz upotrebu dva antitela specifična za MMP-9 (hvatajuće i detektujuće) i identični su principu i proceduri opisanim za ELISA kit za određivanje koncentracije MMP-9 istog proizvođača. Apsorbanca je merena na plejt čitaču na 450 nm. Na osnovu apsorbanci standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija

MMP-9 u uzorcima. Koncentracija je preračunata u pg/ml, a zatim izražena na mg proteina.

3.7.14. Određivanje koncentracije kaspaze-3 u homogenatu retine

Koncentracija kaspaze-3 u homogenatu retine određivana je enzimskim imunoesejem (ELISA) u skladu sa uputstvom proizvođača (Glory Science Co, Ltd., Shangai, China). Procedura određivanja koncentracije kaspaze-3 zasniva se na kvantitativnoj sendvič imunoenzimskoj tehnici uz upotrebu dva monoklonska antitela specifična za kaspazu-3 (hvatajuće i detektujuće). Hvatajuće antitelo je vezano za dno bunarića mikrotitracione ploče. Detektujuće antitelo je antitelo konjugovano sa peroksidazom iz rena (HRP). Enzim peroksidaza rena detektuje se reakcijom sa supstratom TMB pri čemu se javlja plava boja. Reakcija se zatim prekida dodavanjem kiseline, pri čemu se plava boja menja u žutu i intenzitet boje se očitava spektrofotometrijski. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji kaspaze-3 u prvom koraku.

Reagensi (konjugovano anti-kaspaza-3 antitelo, pufer za ispiranje) i rastvori standarda su pripremani prema uputstvu proizvođača. U odgovarajuće bunariće mikrotitracione ploče obložene antitelom na kaspazu-3 dodavani su standardi pripremljeni po uputstvu i ispitivani uzorci (razblaženje 1:4) u zapremini od 50 µl. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta na temperaturi od 37°C i ispiranja na automatskom ispiraču mikrotitracionih ploča, u bunariće je dodavano po 50 µl HRP konjugata. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta na temperaturi od 37°C i ispiranja u bunariće je dodavano po 50 µl hromogena A i B. Nakon inkubacije od 15 minuta u tami, na temperaturi od 37°C reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µl stop rastvora nakon čega je na plejt čitaču merena apsorbancia na 450 nm. Na osnovu apsorbanci standarda formirana je standardna kriva koja je upotrebljena za preračunavanje koncentracija kaspaze-3 u uzorcima. Koncentracija kaspaze-3 u ispitivanim uzorcima je preračunata u pmol/l, a zatim izražena na mg proteina.

3.7.15. Određivanje koncentracije proteina u homogenatu retine

Koncentracija proteina u homogenatu retine određivana je metodom po Lauriju uz upotrebu goveđeg serum albumina kao standarda (Lowry i sar., 1951).

Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza proteina i Cu^{2+} jona u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom i triptofanom sadržanim u proteinima. Intenzitet boje je meren na $\lambda = 630 \text{ nm}$. Koncentracije proteina očitavane su sa standardne krive konstruisane na osnovu standardnih koncentracija goveđeg serum albumina.

3.8. Statistička obrada podataka

Statistička analiza prikupljenih podataka obavljena je pomoću programa IBM® SPSS® Statistics 21.0. Podaci su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za sve ispitivane parametre. Shapiro-Wilk-ov test je korišćen za testiranje normalnosti distribucije. Poređenje kontinualnih varijabli je izvedeno upotrebom parametrijskog testa jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) za parametre sa normalnom distribucijom i neparametrijskog Kruskal-Wallis-ovog H testa (neparametrijska jednostruka ANOVA) za varijable koje nemaju normalnu distribuciju (Dunn-ov post-hoc test). Linearne veze između kvantitativnih varijabli utvrđivane su upotrebom Pearson-ovog testa za parametrijske i Spearman-ovog testa za neparametrijske podatke. Nivo značajnosti za sve statističke testove bio je 5% ($p < 0,05$).

4. Rezultati

4.1. Telesna masa, unos hrane i vode eksperimentalnih životinja

U tabeli 2 prikazane su inicijalna telesna masa (izmerena na početku 5. nedelje) i finalna telesna masa životinja (izmerena na kraju 6. nedelje), indeks specifičnog porasta telesne mase, unos hrane, unos vode po životinji za vreme trajanja terapije melatoninom i metforminom .

Tabela 2. Inicijalna telesna masa, finalna telesna masa, indeks specifičnog porasta telesne mase, unos hrane, unos vode po životinji za vreme trajanja terapije melatoninom i metforminom.

Parametri	Grupe					
	I (K)	II (MEL)	III (MET)	IV (STZ/NA)	V (STZ/NA +MEL)	VI (STZ/NA +MET)
Inicijalna telesna masa (g)	351,7±6,9	364,3±12,9	371,4±25,4	352,5±14,9	347,14±11,1	359,0±19,7
Finalna telesna masa (g)	395,0±11,2	400,0±12,9	411,4±27,9	413,7±19,2	385,7±5,3	402,0±28,6
Indeks specifičnog porasta telesne mase (g/kg)	0,12±0,02	0,10±0,03	0,11±0,02	0,17±0,03 ^a	0,11±0,03 ^b	0,12±0,03 ^b
Unos hrane (g/dan)	30,5±2,1	31,1±1,7	28,4±2,2	36,6±3,2 ^a	29,1±3,7 ^b	25,3±4,3 ^{a,b}
Unos vode (ml/dan)	41,2±3,9	40,2±5,0	41,8±2,6	56,7±6,2 ^a	44,6±5,6 ^b	40,8±5,9 ^b

K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom.

Podaci su izraženi kao srednja vrednost±standardna devijacija

Vrednosti označene superskriptom imaju statističku značajnost, $P < 0,05$

^a u odnosu na kontrolnu grupu

^b u odnosu na STZ/NA grupu

Podaci koji se odnose na prethodni period aklimatizacije i formiranja eksperimentalnog modela dijabetesa melitusa tip 2 (od nulte do pete nedelje), nisu prikazani, jer nisu zabeležene statistički značajne razlike između grupa za navedene parametre.

U toku posmatranog perioda nije zabeležena značajna razlika u telesnoj masi između ispitivanih grupa, ali je zabeležen statistički značajno viši indeks specifičnog porasta telesne mase u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, što znači da su ove životinje imale veći porast telesne mase po kilogramu telesne težine u ispitivanom periodu. Takođe, uočeno je da je ispitivani indeks niži kod životinja tretiranih melatoninom ($p < 0,001$) ili metforminom ($p < 0,001$).

Unos hrane i vode u toku posmatranog perioda takođe je bio viši kod životinja sa dijabetesom melitusom tipa 2 ($p < 0,001$). Životinje sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirane melatoninom ili metforminom imale su značajno manji unos hrane i vode u odnosu na netretirane životinje. Efekat metformina na unos hrane kod dijabetičnih životinja bio je posebno naglašen, pri čemu je sličan obrazac sniženja unosa hrane primećen i kod zdravih životinja tretiranih metforminom, ali su razlike u odnosu na netretiranu grupu bile bez statističke značajnosti.

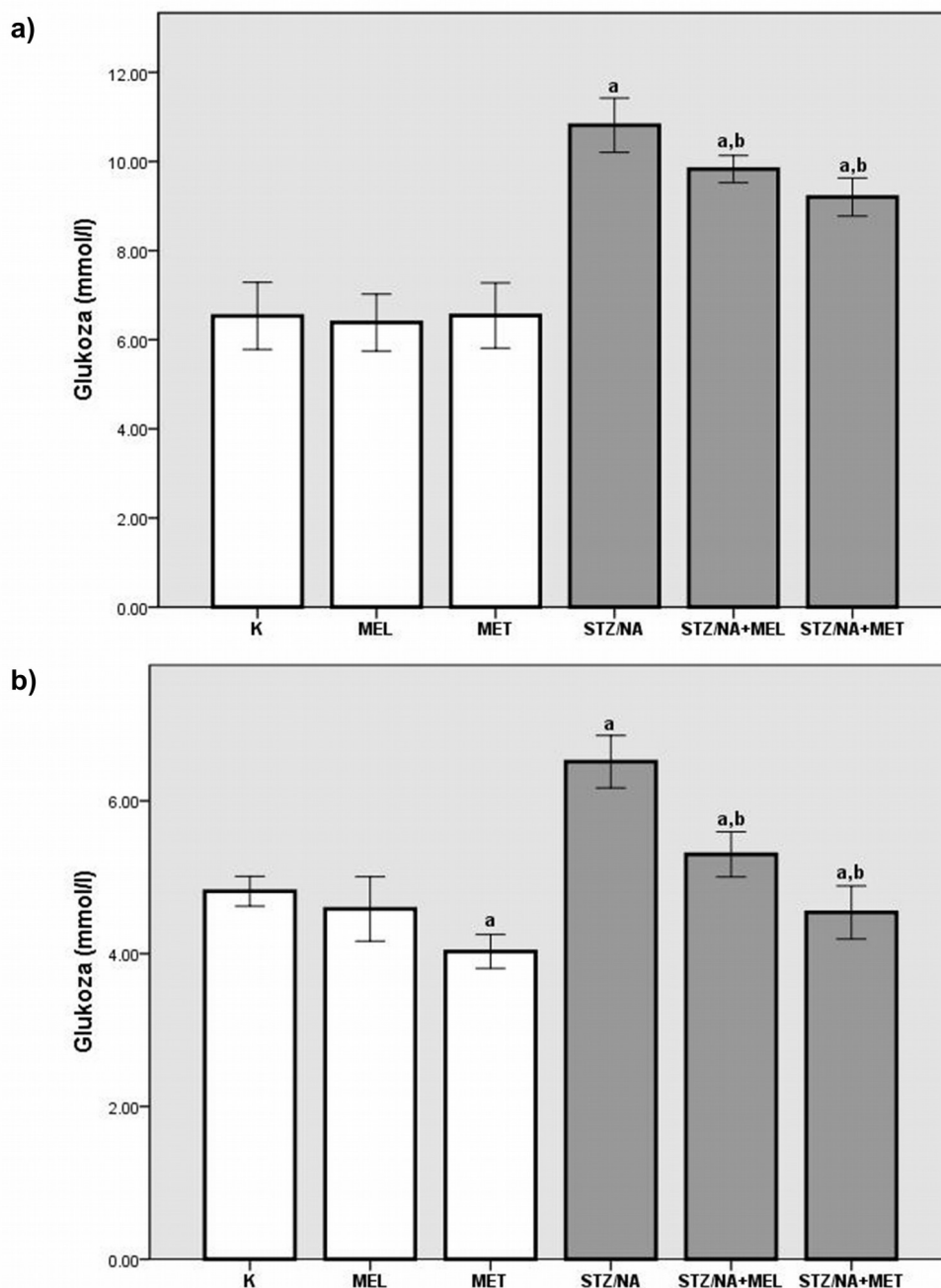
4.2. Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih životinja

Koncentracija glukoze u krvi je, očekivano, bila značajno viša kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u poređenju sa kontrolnom grupom nakon 2 sata (STZ/NA: $10,81 \pm 0,61$ u poređenju sa K: $6,53 \pm 0,75$ mmol/l; $p < 0,001$) i 8 sati (STZ/NA: $6,51 \pm 0,34$ u poređenju sa K: $4,82 \pm 0,19$ mmol/l; $p < 0,001$) gladovanja.

Životinje tretirane melatoninom su imale nižu koncentraciju glukoze u krvi u odnosu na netretirane životinje posle 2 sata (STZ/NA+MEL: $9,82 \pm 0,30$ mmol/l u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$; MEL: $6,38 \pm 0,63$ mmol/l u poređenju sa K, NS) i 8 sati (STZ/NA+MEL: $5,30 \pm 0,29$ mmol/l u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$; MEL: $4,58 \pm 0,42$ mmol/l u poređenju sa K, NS) gladovanja.

Životinje tretirane metforminom, takođe su imale nižu koncentraciju glukoze u krvi u odnosu na netretirane životinje posle 2 sata (STZ/NA+MET: $9,2 \pm 0,42$ mmol/l u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$; MEL: $6,54 \pm 0,68$ mmol/l u poređenju sa K, NS) i 8

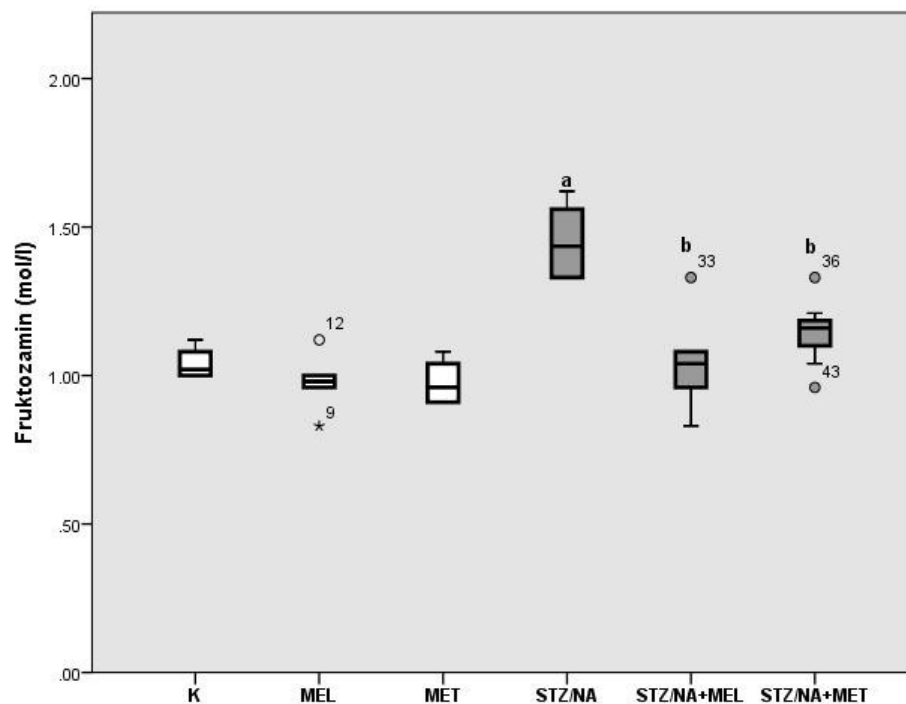
sati (STZ/NA+MET: $4,54 \pm 0,33$ mmol/l u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$; MET: $4,03 \pm 0,21$ mmol/l u poređenju sa K; $p < 0,001$) gladovanja (grafikon 1).



Grafikon 1. Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih životinja izmerena nakon a) 2 i nakon b) 8 sati gladovanja (mmol/l). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji glukoze u krvi između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.3. Koncentracija fruktozamina u serumu eksperimentalnih životinja

Koncentracija fruktozamina (nastalog glikacijom albumina) u serumu, kao i efekti aplikacije melatonina ili metformina na koncentraciju fruktozamina u serumu ispitivanih životinja prikazani su na grafikonu 2.



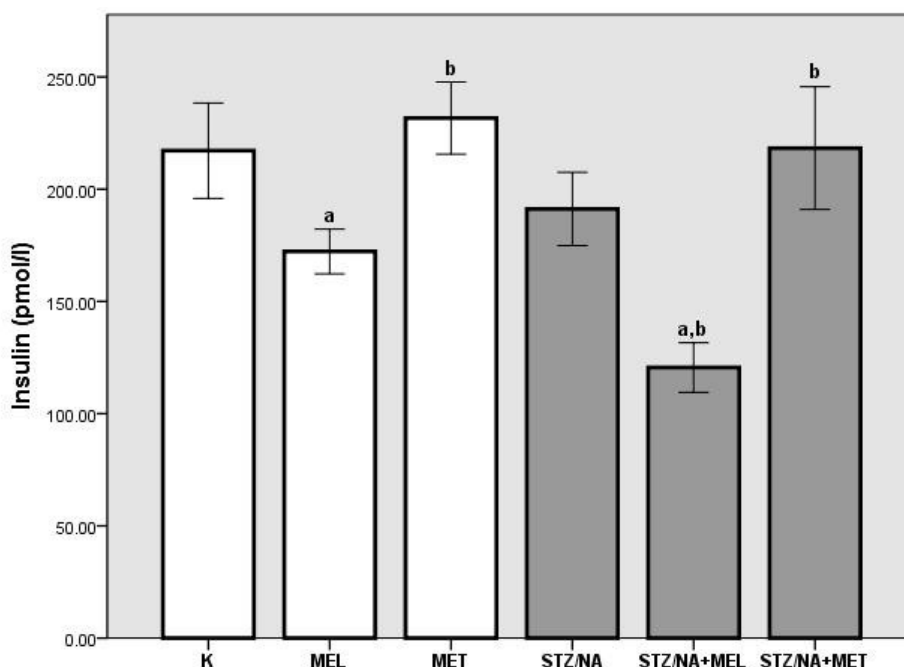
Grafikon 2. Koncentracija fruktozamina u serumu eksperimentalnih životinja (mol/l). K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Kruskal-Wallis-ov test je pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji fruktozamina između ispitivanih grupa $\chi^2(5) = 23,151$, $p < 0,001$ (srednje vrednosti rangova 14,75 za grupu K; 9,83 za grupu MEL; 9,60 za grupu MET; 32,13 za grupu STZ/NA; 14,30 za grupu STZ/NA+MEL; 21,44 za grupu STZ/NA+MET). Dunn-ovim post-hoc testom utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji fruktozamina u serumu između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

Koncentracija fruktozamina je bila viša kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na zdrave životinje (STZ/NA: $1,45 \pm 0,12$ mol/l u poređenju sa K: $1,04 \pm 0,06$ mol/l; $p < 0,01$). Životinje tretirane melatoninom imale su niže vrednosti fruktozamina u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MEL: $1,04 \pm 0,018$ mol/l u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,01$; MEL: $0,98 \pm 0,09$ mol/l u poređenju sa K, NS). Životinje tretirane metforminom takođe su imale niže vrednosti fruktozamina u odnosu

na netretirane životinje (STZ/NA+MET: $1,14 \pm 0,11$ mol/l u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,05$; MET: $0,98 \pm 0,08$ mol/l u poređenju sa K, NS).

4.4. Koncentracija insulina u serumu eksperimentalnih životinja

Koncentracija insulina u krvi nakon osmočasovnog gladovanja, kao i efekti primene melatonina ili metformina na njegove vrednosti prikazani su na grafikonu 3.



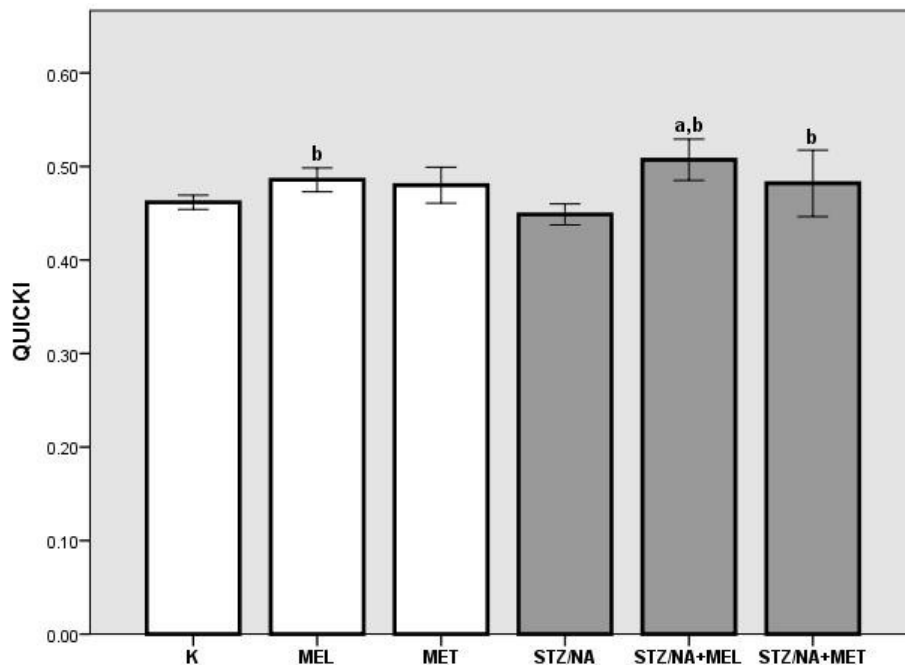
Grafikon 3. Koncentracija insulina u serumu eksperimentalnih životinja (pmol/l). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji insulina u serumu između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u koncentraciji insulina između grupe životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 i kontrolne grupe (STZ/NA: $191,18 \pm 16,31$ pmol/l u poređenju sa K: $217,15 \pm 21,25$ pmol/l, NS, $p = 0,158$) iako je koncentracija cirkulišućeg insulina bila niža kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2. Značajno niža koncentracija insulina nađena je kod grupa tretiranih melatoninom u

odnosu na odgovarajuće netretirane grupe (STZ/NA u poređenju sa STZ/NA+MEL: $120,56 \pm 11,04$ pmol/l, $p < 0,001$; MEL: $172,26 \pm 9,94$ pmol/l u poređenju sa K, $p < 0,01$) i grupe tretirane metforminom (STZ/NA+MET u poređenju sa STZ/NA+MEL, $p < 0,001$; MET u poređenju sa MEL, $p < 0,001$). Životinje tretirane metforminom imale su više koncentracije cirkulišućeg insulina od netretiranih životinja, ali je ovaj efekat bio statistički značajan samo kod životinja sa dijabetesom melitusom tipa 2 (STZ/NA u poređenju sa STZ/NA+MET: $218,27 \pm 27,33$ pmol/l, $p < 0,05$; MET: $231,67 \pm 16,09$ pmol/l u poređenju sa K, NS).

4.5. Vrednosti kvantitativnog indeksa provere insulinske senzitivnosti kod eksperimentalnih životinja

Kvantitativni indeks provere insulinske senzitivnosti (QUICKI) je preračunat iz vrednosti glikemije i insulina i vrednosti su predstavljene na grafikonu 4.



Grafikon 4. Vrednosti kvantitativnog indeksa provere insulinske senzitivnosti kod eksperimentalnih životinja. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u vrednostima QUICKI između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

Nisu zabeležene značajne razlike u vrednosti QUICKI indeksa između grupe sa dijabetesom melitusom tip 2 i kontrolne grupe (STZ/NA: $0,45 \pm 0,01$ u poređenju sa K: $0,46 \pm 0,01$, NS). Ipak, QUICKI indeks je bio viši u grupama životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 tretiranim melatoninom (K u poređenju sa K+MEL: $0,49 \pm 0,01$, NS; STZ/NA u poređenju sa STZ/NA+MEL: $0,51 \pm 0,23$, $p < 0,001$) ili metforminom (K u poređenju sa K+MET: $0,48 \pm 0,02$, NS; STZ/NA u poređenju sa STZ/NA+MET: $0,48 \pm 0,36$, $p < 0,05$). Vrednosti QUICKI indeksa u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, tretiranim melatoninom, bile su statistički značajno više u odnosu na one nađene u kontrolnoj grupi (STZ/NA+MET u poređenju sa K, $p < 0,01$).

4.6. Koncentracija triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola u serumu eksperimentalnih životinja

Vrednosti serumskih lipida prikazane su u tabeli 3. Koncentracija triglicerida nije se značajno razlikovala između grupe životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 i kontrolne grupe. Ipak, niže koncentracije triglicerida su nađene u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 tretiranim melatoninom (STZ/NA u poređenju sa STZ/NA+MEL, $p < 0,05$). Trigliceridi su, takođe, bili niži u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 tretiranim metforminom, ali razlika nije bila statistički značajna. Ukupni holesterol u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 je bio niži u odnosu na kontrolnu grupu (K u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$). Zabeleženo sniženje ukupnog holesterola kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 nastalo je zbog sniženja HDL frakcije (STZ/NA u poređenju sa K, $p < 0,001$), pri čemu se koncentracija LDL frakcije kod ispitivanih životinja nije značajnije menjala (STZ/NA u poređenju sa K, NS).

Ni melatonin, ni metformin nisu ostvarili statistički značajni efekat na nivo ukupnog i LDL holesterola kod eksperimentalnih životinja, iako su izmerene vrednosti ukupnog holesterola kod životinja tretiranih melatoninom sa dijabetesom melitusom tip 2 bile nešto više u odnosu na vrednosti izmerene kod netretiranih životinja (STZ/NA+MEL u poređenju sa STZ/NA, $p = 0,071$). Izmerena koncentracija HDL holesterola kod životinja tretiranih melatoninom bila je značajno viša u odnosu na netretirane životinje sa dijabetesom melitusom tip 2 (STZ/NA+MEL u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$).

Tabela 3. Koncentracija triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola u serumu eksperimentalnih životinja.

Parametri	Grupe					
	I (K)	II (MEL)	III (MET)	IV (STZ/NA)	V (STZ/NA +MEL)	VI (STZ/NA +MET)
Trigliceridi (mmol/l)	0,43±0,09	0,39±0,10	0,41±0,07	0,55±0,10	0,41±0,05 ^b	0,50±0,06
Ukupni holesterol (mmol/l)	2,13±0,10	2,09±0,07	2,15±0,18	1,85±0,80 ^a	2,00±0,07	1,83±0,84 ^a
HDL holesterol (mmol/l)	1,52±0,06	1,50±0,06	1,54±0,18	1,20±0,06 ^a	1,42±0,07 ^b	1,22±0,61 ^a
LDL holesterol (mmol/l)	0,42±0,01	0,41±0,01	0,42±0,02	0,40±0,02	0,39±0,15	0,38±0,01
LDL/HDL holesterol	0,27±0,01	0,28±0,02	0,28±0,02	0,34±0,03 ^a	0,28±0,02 ^b	0,31±0,01

K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom.

Podaci su izraženi kao srednja vrednost±standardna devijacija.

Vrednosti označene superskriptom imaju statističku značajnost.

^a u odnosu na kontrolnu grupu, $p < 0,05$;

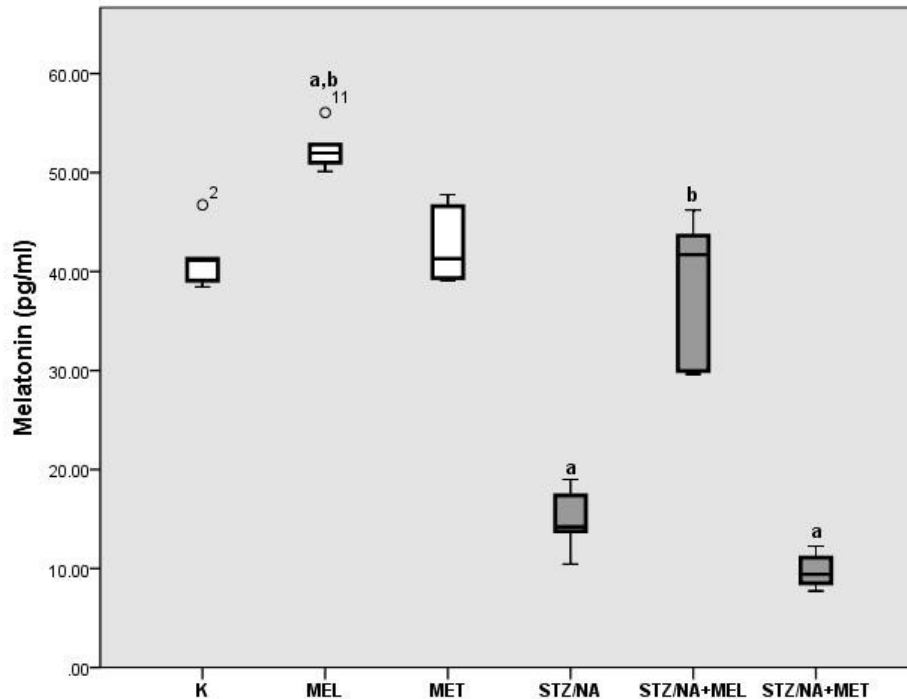
^b u odnosu na STZ/NA grupu, $p < 0,05$.

Odnos LDL/HDL holesterola bio je značajno viši kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na kontrolnu grupu (STZ/NA u poređenju sa K, $p < 0,001$). Životinje sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirane melatoninom imale su značajno niži odnos LDL/HDL u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MEL u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,001$). Terapija metforminom nije izazvala značajne promene ovog odnosa (STZ/NA+MET u poređenju sa STZ/NA, NS)

4.7. Koncentracija melatonina u serumu eksperimentalnih životinja

Koncentracija melatonina u serumu prikazana je na grafikonu 5. Koncentracija melatonina izmerena u serumu životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 bila je značajno niža u odnosu na koncentraciju izmerenu u kontrolnoj grupi (STZ/NA: $15,13 \pm 2,94$ pg/

ml u poređenju sa K: $41,34 \pm 3,26$ pg/ml, $p < 0,05$). Očekivano, koncentracija melatonina je bila viša u grupi tretiranih životinja (STZ/NA+MEL: $38,80 \pm 7,28$ pg/ml u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,05$; K+MEL: $52,32 \pm 2,06$ pg/ml u poređenju sa K, $p < 0,05$). Koncentracija melatonina izmerena u grupi zdravih životinja i životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 koje su dobijale metformin nije se značajno razlikovala u odnosu na netretirane životinje (K+MET: $42,82 \pm 4,10$ pg/ml u poređenju sa K, NS; STZ/NA+MET: $9,80 \pm 1,86$ pg/ml u poređenju sa STZ/NA, NS).

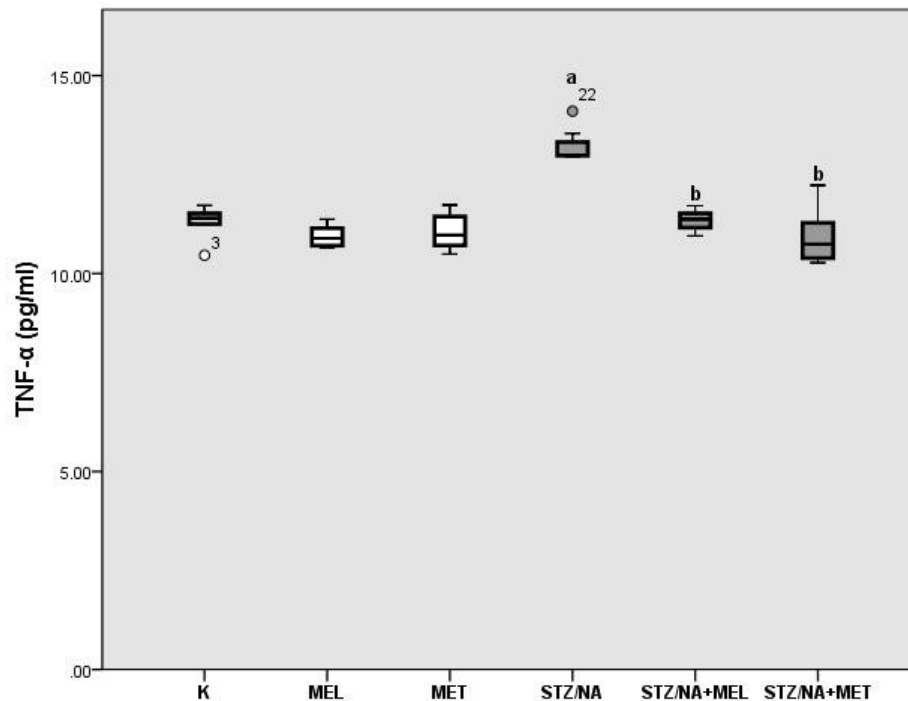


Grafikon 5. Koncentracija melatonina u serumu eksperimentalnih životinja (pg/ml). K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Kruskal-Wallis-ov test je pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji melatonina između ispitivanih grupa $\chi^2(5) = 28,965$, $p < 0,001$ (srednje vrednosti rangova 20,00 za grupu K; 31,50 za grupu K+MEL; 22,00 za grupu K+MET; 8,71 za grupu STZ/NA; 19,67 za grupu STZ/NA+MEL; 3,40 za grupu STZ/NA+MET). Dunn-ovim post-hoc testom utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji melatonina u serumu između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.8. Koncentracija faktora nekroze tumora- α u serumu eksperimentalnih životinja

Koncentracija TNF- α u serumu je prikazana na grafikonu 6. Koncentracija TNF- α je bila viša u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u poređenju sa

kontrolnom grupom (STZ/NA: $13,21 \pm 0,41$ pg/ml u poređenju sa K: $11,27 \pm 0,48$ pg/ml; $p < 0,01$). U poređenju sa netretiranim životinjama sa dijabetesom melitusom tipa 2, koncentracija TNF- α u serumu bila je značajno niža kod životinja tretiranih melatoninom (STZ/NA+MEL: $11,34 \pm 0,28$ pg/ml; $p < 0,01$) ili metforminom (STZ/NA+MET: $10,92 \pm 0,62$ pg/ml, $p < 0,001$).

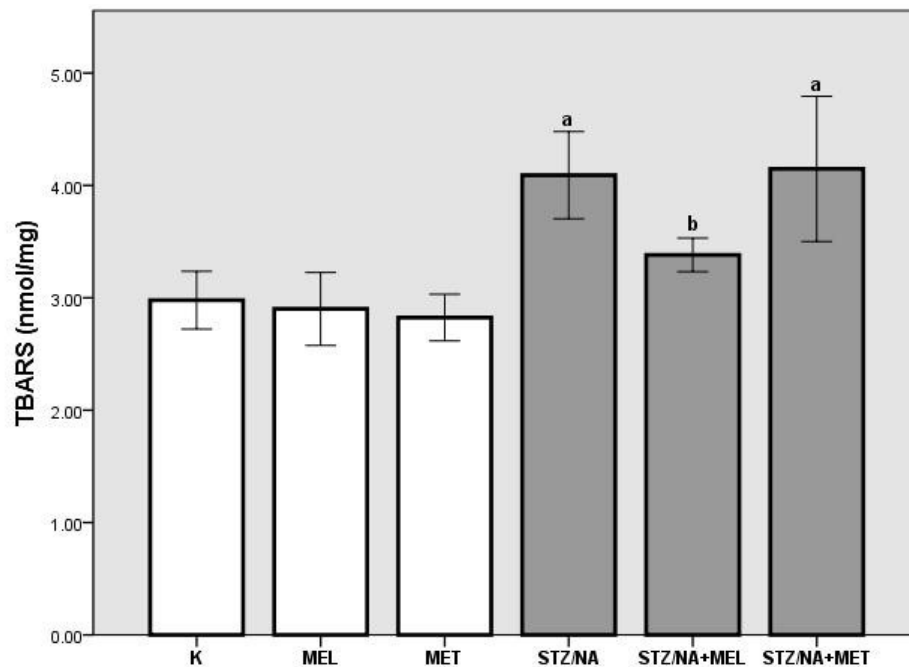


Grafikon 6. Koncentracija TNF- α u serumu eksperimentalnih životinja (pg/ml). K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Kruskal-Wallis-ov test je pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji TNF- α između ispitivanih grupa $\chi^2(5) = 23,277$, $p < 0,001$ (srednje vrednosti rangova 22,60 za grupu K; 14,14 za grupu MEL; 18,21 za grupu MET; 39,50 za grupu STZ/NA; 24,14 za grupu STZ/NA+MEL; 13,50 za grupu STZ/NA+MET). Dunn-ovim post-hoc testom utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji TNF- α u serumu između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.9. Koncentracija tiobarbiturat reagujućih supstanci u homogenatu retine

Kao što je prikazano na grafikonu 7, koncentracija tiobarbiturat reagujućih supstanci (TBARS) u homogenatu retine je bila značajno viša kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u poređenju sa kontrolnom grupom (STZ/NA: $4,09 \pm 0,39$

u poređenju sa K: $2,98 \pm 0,26$ nmol/mg proteina; $p < 0,001$). Grupe tretirane melatoninom imale su niže vrednosti TBARS u homogenatu retine, pri čemu je razlika bila statistički značajna kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 (STZ/NA+MEL: $3,38 \pm 0,15$ nmol/mg u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,01$; MEL: $2,90 \pm 0,32$ nmol/mg u poređenju sa K, NS). Životinje tretirane metforminom nisu pokazale sniženje koncentracije TBARS u homogenatu retine u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MET: $4,15 \pm 0,64$ nmol/mg u poređenju sa STZ/NA, NS; MET: $2,82 \pm 0,21$ nmol/mg u poređenju sa K, NS) .

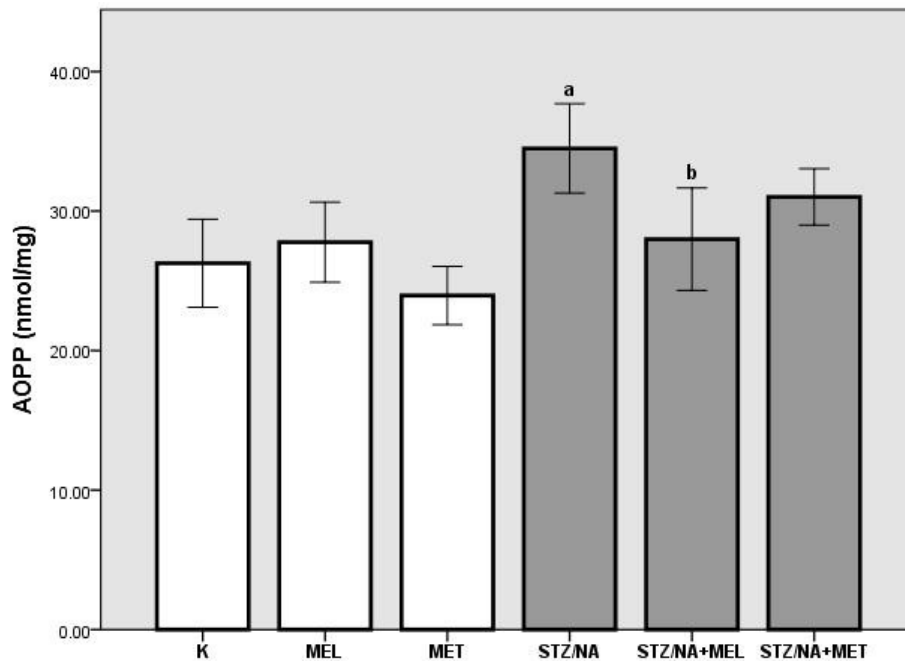


Grafikon 7. Koncentracija TBARS u tkivu retine eksperimentalnih životinja (nmol/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji TBARS u tkivu retine između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.10. Koncentracija proizvoda uznapredovale oksidacije proteina u homogenatu retine

Koncentracija proizvoda uznapredovale oksidacije proteina (AOPP; grafikon 8) je takođe bila značajno viša kod životinja sa poremećenom tolerancijom glukoze u odnosu na kontrolnu grupu (STZ/NA: $34,49 \pm 3,21$ u poređenju sa K: $26,26 \pm 3,16$ nmol/mg proteina; $p < 0,001$). Životinje sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirane

melatoninom imale su niže koncentracije AOPP u homogenatu retine u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MEL: $27,98 \pm 3,67$ nmol/mg u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,01$; MEL: $27,77 \pm 2,87$ nmol/mg u poređenju sa K, NS). Životinje tretirane metforminom imale su niže koncentracije AOPP u homogenatu retine u odnosu na netretirane životinje, ipak nađena razlika nema statističku značajnost (STZ/NA+MET: $31,01 \pm 2,02$ nmol/mg u poređenju sa STZ/NA, NS; MET: $23,95 \pm 2,09$ nmol/mg u poređenju sa K, NS).

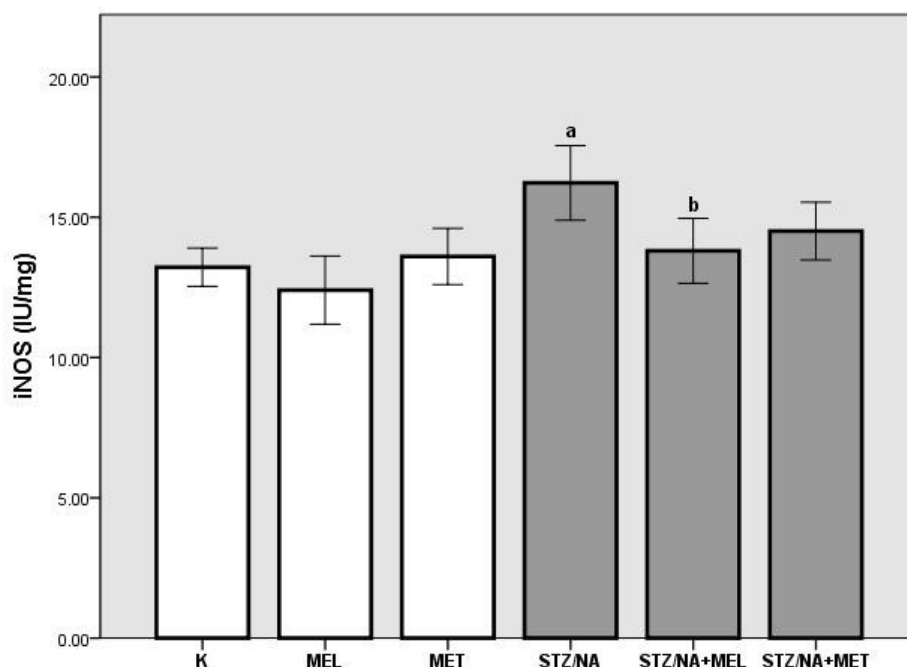


Grafikon 8. Koncentracija AOPP u tkivu retine eksperimentalnih životinja (nmol/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji AOPP u tkivu retine između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.11. Koncentracija inducibilne azot-monoksid sintaze u homogenatu retine

Koncentracija iNOS u homogenatu retine prikazana je na grafikonu 9. Koncentracija iNOS u homogenatu retine bila je značajno viša u grupi sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na kontrolnu grupu (STZ/NA: $16,22 \pm 1,33$ IU/mg u poređenju sa K: $13,22 \pm 0,68$ IU/mg proteina; $p < 0,001$). Životinje sa dijabetesom

melitusom tip 2 tretirane melatoninom imale su niže vrednosti iNOS u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MEL: $13,80 \pm 1,15$ IU/mg u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,01$). Metformin nije ostvario statistički značajan efekat na koncentraciju iNOS u retini, iako su koncentracije iNOS i kod životinja tretiranih metforminom bile niže u odnosu na one izmerene kod netretiranih životinja (STZ/NA+MET: $14,51 \pm 1,03$ IU/mg u poređenju sa STZ/NA, $p = 0,142$, NS).

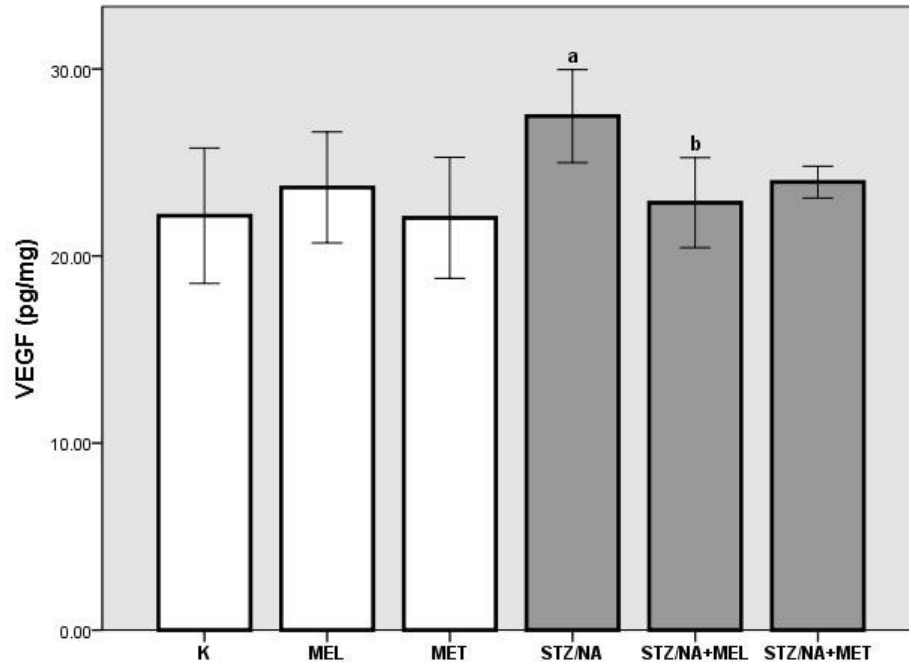


Grafikon 9. Koncentracija iNOS u tkivu retine eksperimentalnih životinja (IU/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji iNOS u tkivu retine između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.12. Koncentracija vaskularnog endotelnog faktora rasta u homogenatu retine

Kao što je prikazano na grafikonu 10, koncentracija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) u homogenatu retine je bila značajno viša u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na kontrolnu grupu (STZ/NA: $27,48 \pm 2,48$ pg/mg u poređenju sa K: $22,15 \pm 3,61$ pg/mg proteina; $p < 0,05$). Životinje sa dijabetesom

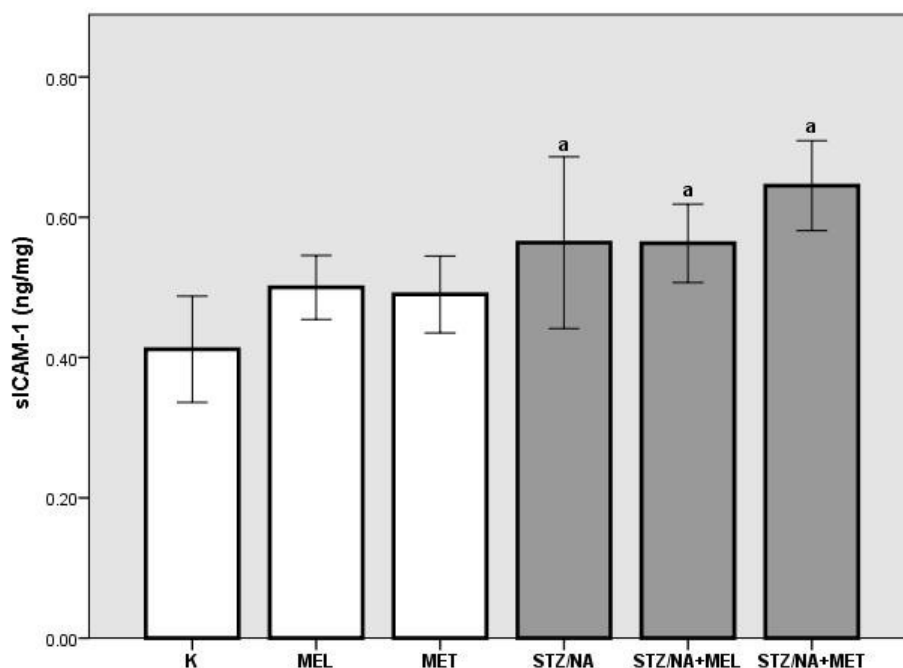
melitusom tip 2 tretirane melatoninom imale su niže vrednosti VEGF-a u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MEL: $22,85 \pm 2,40$ pg/mg u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,05$). Životinje tretirane metforminom takođe su imale niže vrednosti VEGF, ali razlika nije bila statistički značajna (STZ/NA+MET: $23,95 \pm 0,85$ pg/mg u poređenju sa STZ/NA, $p = 0,182$)



Grafikon 10. Koncentracija VEGF-a u tkivu retine eksperimentalnih životinja (pg/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji VEGF u tkivu retine između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.13. Koncentracija solubilnog intercelularnog adhezionog molekula 1 u homogenatu retine

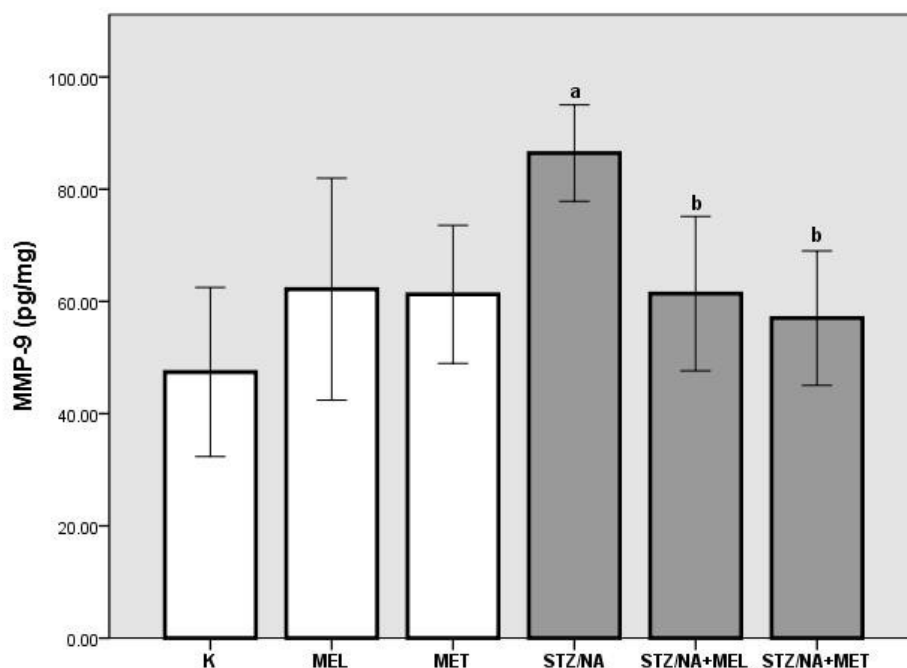
Koncentracija sICAM-1 u homogenatu retine prikazana je na grafikonu 11. Koncentracija sICAM-1 je bila značajno viša u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na kontrolnu grupu (STZ/NA: $0,56 \pm 0,12$ u poređenju sa K: $0,41 \pm 0,07$ ng/mg proteina; $p < 0,05$). Ni melatonin ni metformin nisu ispoljili značajne efekte na koncentraciju sICAM-1 u homogenatu retine.



Grafikon 11. Koncentracija sICAM-1 u tkivu retine eksperimentalnih životinja (ng/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji sICAM-1 u tkivu retine između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.14. Koncentracija matriks metaloproteinaze 9 u homogenatu retine

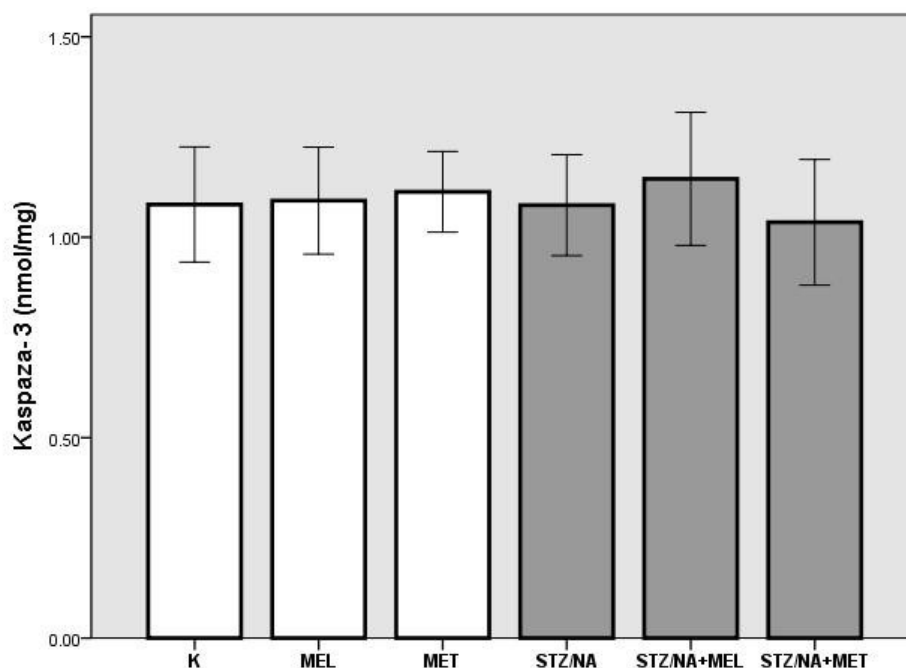
Koncentracija MMP-9 u homogenatu retine prikazana je na grafikonu 12. Koncentracija MMP-9 u homogenatu retine bila je značajno viša u grupi sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na kontrolnu grupu (STZ/NA: $86,43 \pm 8,58$ u poređenju sa K: $47,41 \pm 15,06$ pg /mg proteina; $p < 0,001$). Životinje sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirane melatoninom imale su niže vrednosti MMP-9 u odnosu na netretirane životinje (STZ/NA+MEL: $61,38 \pm 13,75$ pg/mg u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,05$). Metformin je ostvario još izraženiji efekat na koncentraciju MMP-9 u retini (STZ/NA+MET: $57,03 \pm 11,98$ pg/mg u poređenju sa STZ/NA, $p < 0,01$)



Grafikon 12. Koncentracija MMP-9 u tkivu retine eksperimentalnih životinja (pg/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji MMP-9 u tkivu retine između ispitivanih grupa; a, $p < 0,05$ u poređenju sa K; b, $p < 0,05$ u poređenju sa STZ/NA.

4.15. Efekat melatonina na koncentraciju kaspaze-3 u homogenatu retine

Koncentracija kaspaze-3 (nmol/mg) u homogenatu retine prikazana je na grafikonu 13. Koncentracija kaspaze-3 nije značajno varirala između ispitivanih grupa (K: $1,21 \pm 0,21$; MEL: $1,06 \pm 0,16$; MET: $1,11 \pm 0,10$; STZ/NA: $1,98 \pm 0,31$; STZ/NA+MEL: $1,15 \pm 0,17$; STZ/NA+MET: $1,29 \pm 0,18$ nmol/mg proteina).



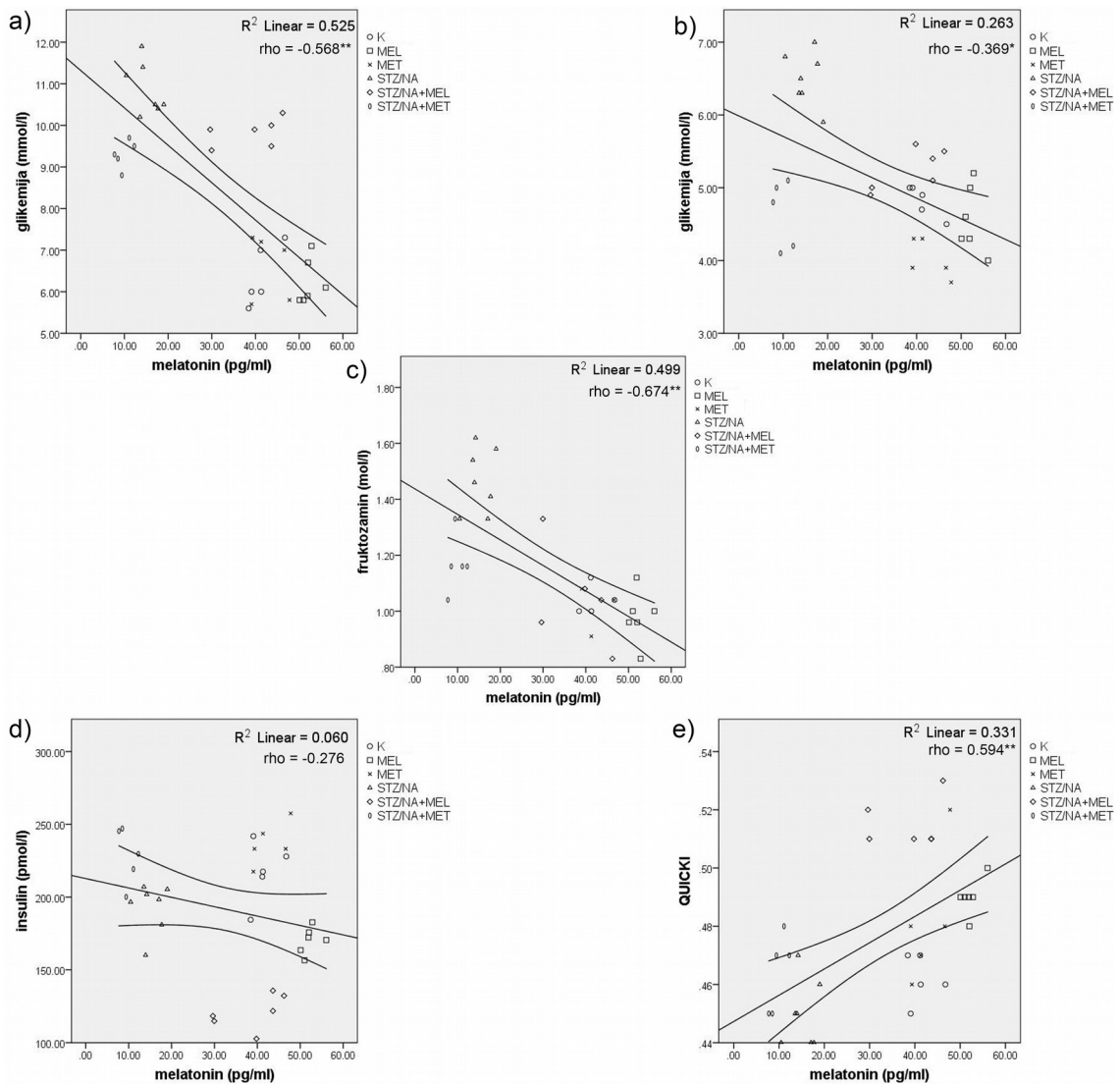
Grafikon 13. Koncentracija kaspaze-3 u retini eksperimentalnih životinja (nmol/mg proteina). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. K – kontrolna grupa, MEL – kontrolna grupa tretirana melatoninom, MET – kontrolna grupa tretirana metforminom, STZ/NA – dijabetična grupa, STZ/NA+MEL – dijabetična grupa tretirana melatoninom, STZ/NA+MET – dijabetična grupa tretirana metforminom. Testom jednostruka ANOVA (Tukey-jev post-hoc test) nije utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji kaspaze-3 u tkivu retine između ispitivanih grupa.

4.16. Korelacija koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijama parametara metabolizma glukoze i serumskih lipida

Regresionom analizom koeficijenta determinacije utvrđeno je postojanje statistički značajne linearne zavisnosti između koncentracije melatonina u krvi i glikemije nakon 2 ($p < 0,001$) i 8 ($p < 0,05$) sati gladovanja, fruktozamina ($p < 0,001$), ukupnog ($p < 0,001$), HDL ($p < 0,001$), LDL ($p < 0,01$) holesterola i triglicerida ($p < 0,01$), kao i vrednosti QUICKI indeksa ($p < 0,001$).

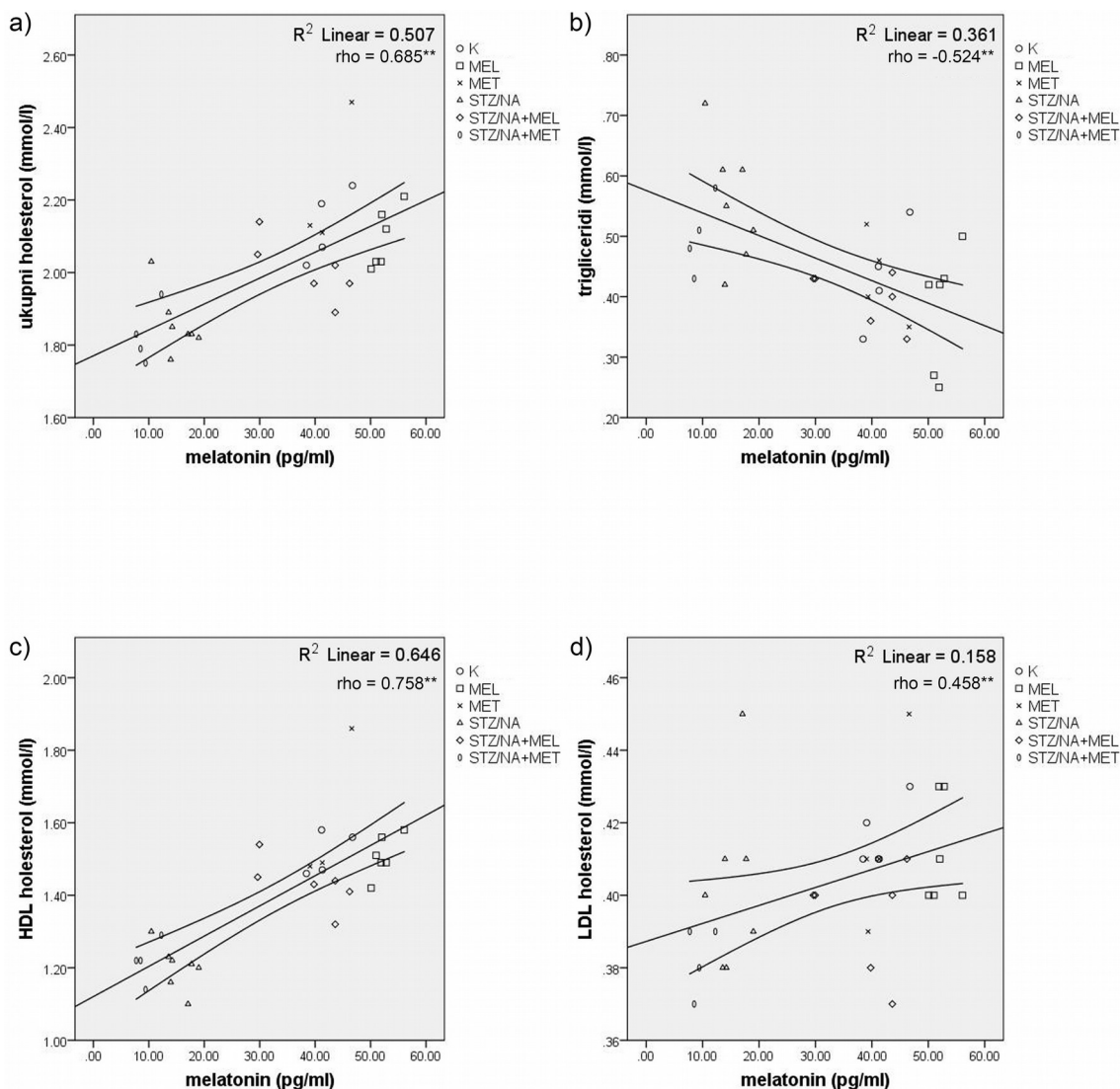
Primenom Spearman-ovog testa korelacije ranga utvrđeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije između koncentracije melatonina i glikemije nakon 2 ($\rho = -0,568$, $p < 0,001$; grafikon 14a) i 8 sati gladovanja ($\rho = -0,369$, $p < 0,01$; grafikon 14b), melatonina i fruktozamina ($\rho = -0,674$, $p < 0,001$; grafikon 14c), melatonina i triglicerida ($\rho = -0,524$, $p < 0,01$, grafikon 15b), kao i statistički značajne pozitivne korelacije koncentracije melatonina i ukupnog holesterola ($\rho = -0,674$, $p <$

0,001, grafikon 15a), melatonina i HDL holesterola ($\rho = -0,758$, $p < 0,001$, grafikon 15c) melatonina i LDL holesterola ($\rho = -0,458$, $p < 0,01$, grafikon 15d).



Grafikon 14. Korelacija između koncentracije melatonina u serumu i a) glikemije nakon 2 sata gladovanja, b) glikemije nakon 8 sati gladovanja, c) fruktozamina, d) insulina, e) vrednosti QUICKI. Spearman-ov (ρ) test korelacije ranga. ** korelacija je statistički značajna za vrednosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

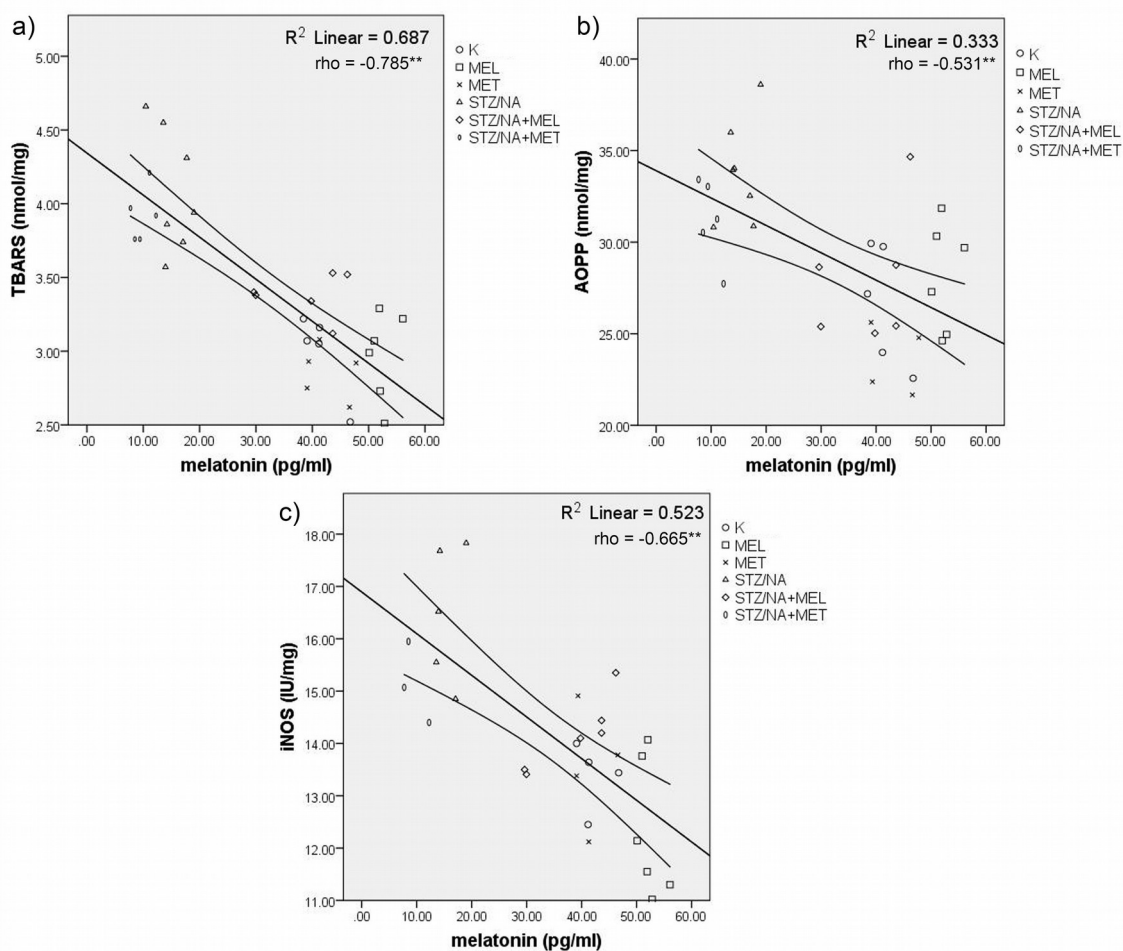
Utvrđeno je i postojanje statistički značajne pozitivne korelacije vrednosti QUICKI indeksa i koncentracije melatonina ($\rho = -0,594$, $p < 0,001$, grafikon 14e). Korelacija sa koncentracijom insulina nije bila statistički značajna (slika 30d).



Grafikon 15. Korelacija između koncentracije melatonina u serumu i a) ukupnog holesterola, b) triglicerida, c) HDL holesterola, d) LDL holesterola, Spearman-ov (ρ) test korelacije ranga. ** korelacija je statistički značajna za vrednosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

4. 17. Korelacija koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijama parametara oksidativnog oštećenja u retini

Analizom koeficijenta determinacije utvrđeno je i postojanje statistički značajne linearne zavisnosti između koncentracije melatonina u krvi i koncentracije TBARS ($p < 0,001$) i AOPP ($p < 0,001$) kao i koncentracije iNOS ($p < 0,001$) u retini.

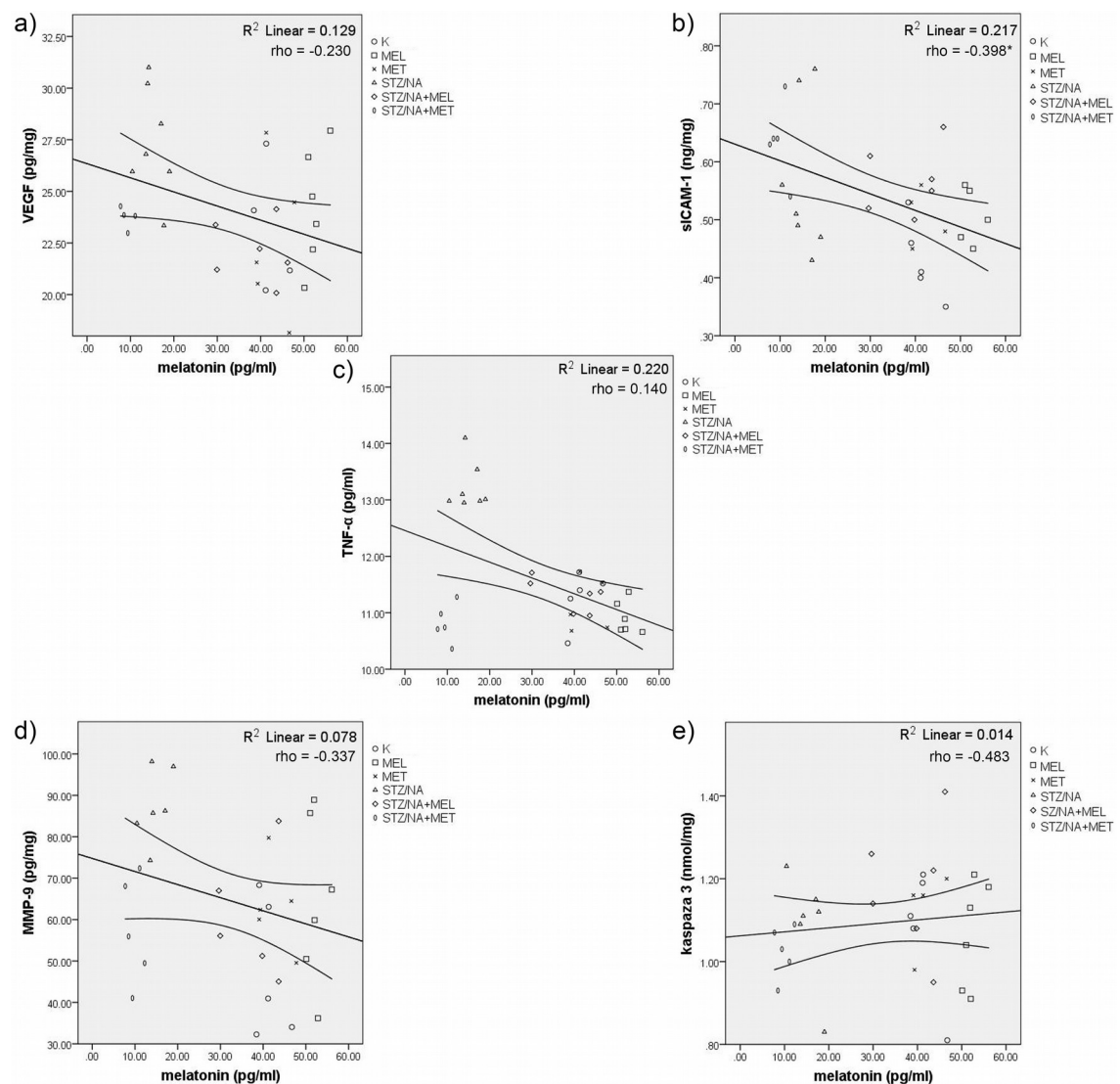


Grafikon 16. Korelacija između koncentracije melatonina u serumu i a) koncentracije TBARS, b) koncentracije AOPP, c) koncentracije iNOS. Spearman-ov test korelacije ranga. **/ korelacija je statistički značajna za vrednosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

Spearman-ovim testom korelacije ranga utvrđeno je postojanje negativne korelacije između koncentracije melatonina i TBARS ($\rho = -0,785$, $p < 0,001$; grafikon 16a), negativne korelacije koncentracije melatonina i AOPP ($\rho = -0,531$, $p < 0,001$, grafikon 16b), kao i negativne korelacije koncentracije melatonina i koncentracije iNOS ($\rho = -0,665$, $p < 0,001$, grafikon 16c).

4.18. Korelacija koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijom citokina, adhezivnih molekula i enzima uključenih u inflamaciju, neovaskularizaciju i apoptozu u retini

Linearnom regresijom utvrđena je udruženost koncentracije melatonina u serumu sa koncentracijom sICAM (p < 0,05) u retini.



Grafikon 17. Korelacija između koncentracije melatonina u serumu i koncentracije a) VEGF, b) sICAM-1, c) TNF- α , d) MMP-9, e) kaspaze-3. Spearman-ov test korelacije ranga. */** korelacija je statistički značajna za vrednosti p < 0,05 i p < 0,01.

Spearman-ovim testom rang korelacije potvrđena je slaba korelacija koncentracije sICAM sa koncentracijom melatonina u serumu ($\rho = -0,398$, $p < 0,05$, grafikon 17b). Korelacije sa koncentracijom TNF- α , VEGF-a, MMP-9 i kaspaze-3 nisu bile statistički značajne.

5. Diskusija

Animalni model dijabetesa melitusa tip 2 indukovano aplikacijom streptozotocina i nikotinamida, karakteriše se umerenom i stabilnom hiperglikemijom, intolerancijom glukoze, izmenjenim insulinskim odgovorom na opterećenje glukozom i *in vitro* i *in vivo* osetljivošću na derivate sulfonilureje (Masiello, 1998). Model dijabetesa melitusa tip 2 izazvan streptozotocin-nikotinamidom se pokazao korisnim u ispitivanju različitih aspekata dijabetesa, naročito njegovih komplikacija i anti-dijabetesnog potencijala novih lekova i prirodnih proizvoda (Szkudelski, 2012).

Prva oštećenja krvno-retinalne barijere kod pacova tretiranih streptozotocinom registruju se nakon 2 nedelje od nastanka hiperglikemije, da bi se već u toku četvrte nedelje javilo istanjenje spoljašnjeg nuklearnog sloja u retini (Rungger-Brändle i sar., 2000; Zhang i sar., 2008). Nakon 8 nedelja javlja se smanjenje broja pericita i endotelnih ćelija, što je praćeno nastankom acelularnih kapilara (Li i sar., 2017).

Animalni model predložen od strane Masiella i sar. (1998) koji je korišćen u ovom istraživanju predstavlja model dijabetesa melitusa tip 2. Životinje iz STZ/NA grupe ovog eksperimenta kod kojih je indukovana poremećena tolerancija glukoze imale su značajno višu glikemiju u odnosu na životinje iz kontrolne grupe ($p < 0,001$). Dobijene vrednosti glikemije u STZ/NA grupi su ipak značajno niže u odnosu na one koje bi bile dobijene ubrizgavanjem slične doze streptozotocina (50 mg/kg), bez nikotinamida (Tahara i sar., 2008).

5.1. Analiza efekata primene melatonina na telesnu masu eksperimentalnih životinja

Melatonin može biti uključen u regulaciju telesne mase i energetskog metabolizma, pri čemu je ovaj efekat najpre utvrđen kod životinja čija se telesna masa menja u sklopu sezonskih ritmova (Morgan i Mercer, 2001). Administriranje melatonina dovodi do smanjenja telesne mase kod zdravih (Ríos-Lugo i sar., 2010) i dijabetičnih pacova (Agil i sar., 2012, 2011) kao i pacova sa metaboličkim sindromom izazvanim administriranjem 10% fruktoze (Cardinali i sar., 2013) ili ishranom bogatom mastima (Ríos-Lugo i sar., 2010). Melatonin je u navedenim istraživanjima primenjen

oralno, u vodi za piće, u dozama 10 mg/kg telesne mase (Agil i sar., 2011) i 25µg/ml (Cardinali i sar., 2013; Ríos-Lugo i sar., 2010), koje su značajno više od one primenjene u ovom istraživanju (0,2 mg/kg; 2 µg/ml)

U toku ovog istraživanja nije zabeležena značajna razlika u telesnoj masi između ispitivanih grupa, ali je zabeležen statistički značajno viši indeks specifičnog porasta telesne mase u grupi životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, što znači da su ove životinje imale veći porast telesne mase po kilogramu telesne težine u ispitivanom periodu. Ispitivani indeks bio je niži kod životinja tretiranih melatoninom ili metforminom, što može biti u vezi sa smanjenim unosom hrane kod tretiranih dijabetičnih životinja u odnosu na netretirane.

5.2. Analiza efekata primene melatonina na koncentracije parametara metabolizma glukoze i lipida u serumu eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2

Rezultati brojnih epidemioloških studija označili su hiperglikemiju kao najznačajniji faktor rizika za nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije (ACCORD Study Group and ACCORD Eye Group i sar., 2010; Klein i sar., 1991; Service i O'Brien, 2001; Stratton i sar., 2001). Mehanizmi kojima hronična hiperglikemija dovodi do nastanka dijabetesne retinopatije do danas nisu u potpunosti razjašnjeni. Metabolički putevi, kao što su put poliola, neenzimska glikacija proteina, aktivacija protein kinaze C, biosinteza heksozamina, zatim oksidativni stres i subklinička inflamacija udružena sa leukostazom mogu predstavljati potencijalnu vezu (Tarr i sar., 2013). Od posebnog je značaja činjenica da se progresija dijabetesne retinopatije nastavlja i nakon uspostavljanja normalne koncentracije glukoze u krvi, što se objašnjava fenomenom metaboličkog pamćenja (Kowluru, 2017; Mishra i Kowluru, 2016).

Velike fluktuacije u koncentraciji glukoze u krvi u postprandijalnom periodu kod životinja sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom melitusom tip 2 (Srinivasan i Ramarao, 2007; Szkudelski, 2012), prema rezultatima Ceriello-a i sar. (2008) mogu dovesti do značajnijeg mikrovaskularnog i oksidativnog oštećenja u odnosu na hroničnu hiperglikemiju. Životinje iz STZ/NA grupe ovog eksperimenta kod kojih je indukovan

dijabetes melitus tip 2 imale su značajno višu koncentraciju glukoze u krvi u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Koncentracija glukoze u krvi životinja u STZ/NA grupi je ipak bila značajno niža u odnosu na onu koja bi bila dobijena ubrizgavanjem slične doze streptozotocina (50 mg/kg), bez nikotinamida u cilju izazivanja dijabetesa melitusa tip 1 (Tahara i sar., 2008). Koncentracija fruktozamina, koji predstavlja meru glikacije serumskih proteina, i predstavlja odraz koncentracije glukoze u krvi u periodu od prethodnih 14 dana (što se podudara sa dužinom trajanja terapije), su u STZ/NA grupi bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. U cilju sprovođenja eksperimenta selektovane su životinje sa koncentracijom glukoze u krvi preko 8,3 mmol/l, jer je prethodnim istraživanjima u skopu DCCT studije utvrđeno da se retinopatija češće razvija pri vrednostima višim od navedene (Service i O'Brien, 2001).

Prethodno je pokazano da oralno aplikovanje melatonina dovodi do snižavanja koncentracije glukoze u krvi kod zdravih pacova i pacova sa metaboličkim sindromom (Agil i sar., 2012; Cardinali i sar., 2013; Ríos-Lugo i sar., 2010), kao i miševa sa hiperglikemijom (Lo i sar., 2017). Kod pacova sa dijabetesom melitusom tip 1 kombinovani tretman melatoninom i insulinom značajno poboljšava kontrolu glikemije (Oliveira i sar., 2018).

Rezultati predstavljani u sklopu ove disertacije, takođe pokazuju da melatonin dovodi do snižavanja koncentracije glukoze u krvi kod pacova sa dijabetesom melitusom tip 2. Tome u prilog govori i sniženje serumske koncentracije fruktozamina kod životinja tretiranih melatoninom. Sniženje koncentracije glukoze u krvi našte, utvrđeno je kod obolelih od dijabetesa melitusa tip 2 u toku suplementacije melatoninom (Raygan i sar., 2017). Pri tumačenju ovih rezultata mora se ipak mora uzeti u obzir činjenica da su efekti melatonina na koncentraciju glukoze u krvi kod pacova, koji su životinje aktivne u toku noći, verovatno bar delom različiti u odnosu na efekte kod ljudi, koji su aktivni i unose hranu u toku dana (Scheer i Czeisler, 2005).

Metformin, lek koji se primenjuje u terapiji hiperglikemije kod obolelih od dijabetesa melitusa tip 2, takođe je pokazao hipoglikemijski efekat i doveo do sniženja koncentracije fruktozamina u serumu pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 u ovoj studiji. Ovaj efekat metformina je posredovan inhibicijom mitohondrijalne glicerofosfat dehidrogenaze (mGPD) koja dovodi do smanjenja konverzije laktata i glicerola u

glukozu (Madiraju i sar., 2014) i povećanjem redoks stanja citoplazme hepatocita (Madiraju i sar., 2018).

Mehanizmi kojima se melatonin uključuje u regulaciju glikemije nisu do kraja ispitani. Činjenica da agonisti melatoninskih receptora ostvaruju pozitivne efekte na toleranciju glukoze kod pacova i miševa sa insulinskom rezistencijom izazvanom dijetom bogatom mastima, sugeriraju da je ovaj efekat posredovan receptorskim mehanizmom (Sartori i sar., 2009; Zhou i sar., 2018). Uklanjanje melatoninskih receptora kod miševa dovodi do poremećaja u dnevnom ritmu vrednosti glikemije, koji se ogleda u promenama noćnih i dnevnih vrednosti koncentracije glukoze u krvi (Owino i sar., 2016).

Efekte posredovane receptorima, značajne za regulaciju glikemije, melatonin ispoljava na nivou endokrinog pankreasa i perifernih tkiva, mišića, masnog tkiva i jetre.

Melatonin može uticati na koncentraciju glukoze u krvi posredstvom efekata koje ostvaruje na preuzimanje glukoze u mišićnom (Ha i sar., 2006) i masnom tkivu (Oliveira i sar., 2018). Stimulacija preuzimanja glukoze nezavisna od insulina, pod dejstvom melatonina utvrđena u *in vitro* studiji na mišićnim ćelijama miša, posredovana je fosforilacijom supstrata za insulinski receptor 1 (IRS-1) i fosfatidil inozitol 3 kinaze (Ha i sar., 2006). Pri tom je utvrđeno da melatonin ne utiče značajno na aktivnost AMPK i MAPK kinaza (Ha i sar., 2006). Melatonin, dodatno, izaziva vazodilataciju u skeletnim mišićima, kao glavnom mestu korišćenja glukoze, kroz povećanu fosforilaciju AKT kinaze i povećanje aktivnosti endotelijalne NO sintaze (Sartori i sar., 2009).

U masnom tkivu, melatonin povećava fosforilaciju insulinskog receptora u odgovoru na insulin verovatno posredstvom fosforilacije AKT kinaze (Alonso-Vale i sar., 2005), pa na taj način može uticati na preuzimanje glukoze u ćelije masnog tkiva mehanizmom zavisnim od insulina.

U jetri pacova sa odstranjenom pinealnom žlezdom utvrđeno je povećanje intenziteta glukoneogeneze i hepaticna insulinska rezistencija, koja se karakteriše smanjenom insulinom stimulisanom fosforilacijom RAC- α serin-treonin protein kinaze i povećanom ekspresijom fosfoenol-piruvat karboksi kinaze, pri čemu se za nastanak ovih poremećaja odgovornim smatra nedostatak melatonina (Nogueira i sar., 2011).

Pored efekata na nivou perifernih tkiva kojima melatonin može uticati na glikemiju, od velikog je značaja i efekat koji ovaj hormon ostvaruje na sintezu i sekreciju insulina. Početkom 70-ih godina prošlog veka, je pokazano da se koncentracije insulina i glukoze u krvi miševa u toku dana menjaju u jasnom cirkadijarnom ritmu (Gagliardino i Hernandez, 1971). Takođe je utvrđeno da pinealektomija dovodi do hiperinsulinemije u toku noći i da izolovane insule pankreasa pacova sa odstranjenom pinealnom žlezdom sekretuju više insulina u odnosu na insule zdravih životinja, mehanizmom koji je nezavisan od stimulacije glukozom (Gorray i sar., 1979). Autori ovih studija su naglasili potrebu za daljim istraživanjima i identifikacijom agensa prisutnog u pinealnoj žlezdi, koji “stimuliše” sekreciju insulina (Gorray i sar., 1979). Postojanje ritmičnih promena koncentracije glukoze i insulina je potvrđeno krajem 90-ih godina, kada je pokazano da koncentracija glukoze u krvi kod pacova dostiže maksimum početkom noći (analogija sa fenomenom zore kod čoveka), a da ritmične promene koncentracije insulina u krvi ne zavise od koncentracije glukoze (Bizot-Espiard i sar., 1998). Savremenim istraživanjima najpre je utvrđeno postojanje melatoninskih receptora na α i β ćelijama insula pankreasa miša, pacova i čoveka (Nagorny i sar., 2011), a zatim potvrđeno da melatonin inhibira sekreciju insulina delujući na MT2 receptore udružene sa inhibitornim G proteinom (G_i) (Mühlbauer i sar., 2011). Pored mehanizma posredovanog receptorima, otkriveno je da melatonin može uticati na bazalnu i stimulisanu sekreciju insulina posredstvom efekta na anti i prooksidativne enzime, utičući na taj način na homeostazu reaktivnih vrsta kiseonika, metabolizam glukoze i sekreciju insulina (Simões i sar., 2016). Prema rezultatima Simoes-a i sar. (2016) aktivnost NADPH oksidaze (NOX), prooksidativnog enzima uključenog u generisanje superoksida, smanjuje se u prisustvu melatonina u *in vitro* uslovima, što dovodi do smanjenog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i smanjene sekrecije insulina. Konačno, nakon što je utvrđena udruženost polimorfizma melatoninskog receptora 1B (MTNR1B) i nastanka dijabetesa melitusa tip 2 kod nosioca ovog polimorfizma (Bouatia-Naji i sar., 2009; Mulder, 2017; Müssig i sar., 2010; Sparsø i sar., 2009; Tam i sar., 2010; Tuomi i sar., 2016; Xia i sar., 2012), pokazano je da melatonin inhibira transkripciju gena za insulin posredstvom MTNR1B (MT2) receptora i to delujući preko MAPK signalnog puta (Li i sar., 2017).

Kada je reč o animalnom modelu dijabetesa melitusa tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom, očekivano je da koncentracija insulina u serumu bude normalna ili snižena (Szkudelski, 2012). Karakteristika ovog modela je izostanak sekrecije insulina pri stimulaciji glukozom, što dovodi do hiperglikemije koja se sporo i postepeno vraća na normalne vrednosti (Szkudelski, 2012). Prema rezultatima istraživanja predstavljenog u ovoj disertaciji, koncentracija insulina u serumu kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 nije se značajno razlikovala od vrednosti kod zdravih životinja, dok su koncentracije insulina bile značajno niže i kod zdravih, ali i kod životinja sa dijabetesom tip 2 tretiranim melatoninom u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Efekat sniženja insulina pod dejstvom melatonina prethodno je pokazan od strane nekoliko grupa autora (Agil i sar., 2012; Ríos-Lugo i sar., 2010). Pri tom, Agil i sar. (2012) su sniženje serumskog insulina u toku terapije melatoninom opisali samo kod dijabetičnih pacova, dok su Rios Lugo i sar. (2010) ovaj efekat registrovali i kod zdravih i kod životinja sa metaboličkim sindromom. Iako neki autori smatraju melatonin i insulin direktnim antagonistima (Peschke i sar., 2011), rezultati istraživanja predstavljenog u ovoj disertaciji nisu pokazali značajnu korelaciju serumskih vrednosti insulina i melatonina kod pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom.

Metformin, ostvaruje svoja dejstva inhibicijom glukoneogeneze u jetri, dok u crevima povećava korišćenje glukoze i stimuliše sekreciju glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) (Rena i sar., 2017). Ovaj peptid luče intestinalne L-ćelije kao odgovor na nutritivne i neurološke stimuluse, pri čemu on dovodi do povećanja glukozo-zavisne sekrecije insulina (Mulherin i sar., 2011). Sistemska dejstva GLP-1 su ograničena zbog kratkog poluživota ovog molekula, koji se unutar nekoliko minuta razlaže pod dejstvom enzima dipeptidil peptidaze 4 (Deacon i sar., 1995). Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji ukazuju da metformin ne ostvaruje značajne efekte na koncentraciju serumskog insulina, što je u skladu sa podacima iz literature (Ehrmann i sar., 1997).

Insulinska senzitivnost predstavlja sposobnost insulina da dovede do sniženja koncentracije glukoze u krvi kroz stimulaciju preuzimanja glukoze u insulin zavisna periferna tkiva i inhibiciju glikoneogeneze. Euglikemijska klamp metoda smatra se referentnom metodom za određivanje insulinske senzitivnosti (DeFronzo i sar., 1979). Indeks insulinske senzitivnosti određen ovom metodom definisan je prosečnom

brzinom infuzije glukoze koja je neophodna za održavanje euglikemije u uslovima konstantne infuzije insulina (DeFronzo i sar., 1979). Ova metoda je međutim, invazivna i njena primena u cilju određivanja insulinske senzitivnosti predstavlja kompleksnu i tehnički komplikovanu proceduru (Singh i Saxena, 2010). Zbog toga su razvijeni jednostavniji metodi za procenu insulinske senzitivnosti kao što su kvantitativni indeks procene insulinske senzitivnosti (QUICKI), homeostazni metod procene insulinske rezistencije (HOMA-IR) i funkcije beta ćelija (HOMA- β) i odnos glukoze i insulina našte (FGIR). Rezultati navedenih metoda dobro koreliraju sa rezultatima euglikemijske klamp metode (Singh i Saxena, 2010). Sem toga, njihova validnost je potvrđena kod čoveka, ali i kod miša i pacova (Ahangarpour i sar., 2017; Birgani i sar., 2018; Cacho i sar., 2008).

Kvantitativni indeks provere insulinske senzitivnosti (QUICKI) predstavlja matematičku formulu koja je izvedena kao recipročna vrednost sume logaritama glikemije i insulina našte, i koja dobro korelira sa euglikemijskom klamp metodom, te se koristi za procenu insulinske senzitivnosti (Katz i sar., 2000). Ovim istraživanjem nisu utvrđene razlike u vrednostima QUICKI indeksa između grupe dijabetičnih i grupe zdravih pacova. Slične rezultate na animalnom modelu dijabetesa melitusa tipa 2 izazvanom streptozotocin-nikotinamidom su prethodno objavili Ahangarpour i sar. (2017). U istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji životinje tretirane melatoninom i metforminom imale su više vrednosti QUICKI indeksa u odnosu na netretirane životinje, što se smatra povoljnim efektom na isulinsku senzitivnost.

Dislipidemija udružena sa dijabetesom melitusom (dislipidemija koja se dijagnostikuje kod obolelih od dijabetesa melitusa tip 2) je poremećaj koncentracije serumskih lipida koji podrazumeva porast koncentracije triglicerida i LDL holesterola (uz predominaciju malih gustih LDL čestica) i sniženje koncentracije HDL holesterola (Wu i Parhofer, 2014). Ovaj poremećaj koncentracije serumskih lipida može doprineti nastanku dijabetesne retinopatije na više načina, iako epidemiološke studije nisu eksplicitno potvrdile uzajamnu vezu (Stratton i sar., 2001). Dislipidemija doprinosi nastanku čvrstih eksudata u sklopu dijabetesne retinopatije (Van Leiden i sar., 2002), dok kontrola koncentracije holesterola i triglicerida u serumu značajno usporava progresiju ove komplikacije dijabetesa melitusa (ACCORD Study Group and ACCORD Eye Group i sar., 2010; Chang i Wu, 2013).

Transport holesterola kroz krvno-retinalnu barijeru je normalno visokoregulisan i ekstravazacija lipoproteina je onemogućena postojanjem tesnih spojeva između ćelija retinalnog pigmentnog epitela koje grade spoljašnju krvno-retinalnu barijeru. Oštećenje krvno-retinalne barijere u sklopu dijabetesne retinopatije dovodi do ekstravazacije lipoproteina krvne plazme, pri čemu oni postaju značajni činilac daljeg oštećenja. Oksidisani i glikozilisani LDL u ekstravaskularnom prostoru retine doprinosi oštećenju retinalnog pigmentnog epitela kroz stimulaciju oksidativnog oštećenja, oštećenja endoplazmatskog retikuluma, autofagije i apoptoze (Du i sar., 2013). Za razliku od nativnih lipoproteinskih čestica, oksidisani i glikozilisani HDL u retini ne ostvaruje značajno protektivno dejstvo (Du i sar., 2013).

Metabolizam holesterola u retini i mozgu razlikuje se u odnosu na metabolizam u ostalim tkivima zbog postojanja krvno-retinalne, odnosno krvno-moždane barijere. Retina za razliku od mozga, potrebe za holesterolom, pored lokalne sinteze zadovoljava preuzimanjem holesterola iz krvi preko retinalnog pigmentnog epitela odnosno spoljašnje krvno-retinalne barijere (Fliesler i Bretillon, 2010). U dijabetesu melitusu, transport holesterola odigrava se i preko unutrašnje krvno-retinalne barijere odnosno retinalne mikrovaskulature (Zheng i sar., 2012). Za razliku od drugih tkiva, koja eliminišu višak holesterola reverznim transportom pomoću HDL-a, u retini je eliminacija moguća i transformacijom holesterola u solubilne oksisterole, posredstvom citohroma P450 (Hammer i sar., 2017; Pikuleva i Curcio, 2014). Solubilni oksisteroli služe kao endogeni ligandi za jetrine X receptore (LXR α /LXR β). Ovi receptori imaju značajnu ulogu u regulaciji reverznog transporta holesterola i supresiji sinteze proinflammatoryh citokina (Hammer i sar., 2017). Obe izoforme receptora su eksprimirane u retini, LXR α u sloju nervnih vlakana i retinalnom pigmentnom epitelu, a LXR β u svim slojevima retine uključujući i retinalni pigmentni epitel (Dwyer i sar., 2011). Utvrđeno je da humane retinalne endotelne ćelije dobijene od donora obolelih od dijabetesa melitusa imaju snižene nivoe receptora LXR α /LXR β u poređenju sa ćelijama zdravih donora (Hammer i sar., 2017). Faktor nekroze tumora- α dovodi do smanjenja ekspresije gena za LXR α receptore u bovinim retinalnim endotelnim ćelijama, što je praćeno smanjenom ekspresijom proteina uključenih u reverzni transport holesterola i povećanom ekspresijom proinflammatoryh citokina (Hammer i sar., 2017). Na taj način,

kroz promene u metabolizmu lipida u samoj retini koje dovode do inflamacije, dislipidemija u dijabetesu može doprineti nastanku dijabetesne retinopatije.

Receptori LXR α /LXR β mogu se aktivirati deacetilacijom lizina pod dejstvom NAD-zavisne deacetilaze, sirutina 1 (Sirt1) koji se smatra značajnim za biološko starenje, apoptozu, inflamaciju, regulaciju metabolizma glukoze, neuralni razvoj, deacetilaciju histona i nehistskih proteina (Li i sar., 2007). Melatonin ostvaruje svoje efekte između ostalog stimulacijom Sirt1/Nrf2 signalnog puta (Shah i sar., 2017).

U animalnom modelu dijabetesa melitusa tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom očekivano je da se jave promene lipidnog statusa. Veći broj autora opisao je porast koncentracije triglicerida u ovom animalnom modelu, pri čemu su vrednosti obično oko 40 % više u odnosu na vrednosti dobijene kod zdravih životinja (Chandran i sar., 2017; Ghasemi i sar., 2014; Krishnasamy i sar., 2016; Novelli i sar., 2004). Koncentracija ukupnog holesterola i LDL holesterola u modelu dijabetesa tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom može biti nepromenjena, povišena ili snižena, dok je koncentracija HDL holesterola obično snižena (Chandran i sar., 2017; Ghasemi i sar., 2014; Krishnasamy i sar., 2016; Novelli i sar., 2004). Iako su kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji vrednosti triglicerida bile oko 30 % više u odnosu na vrednosti kod zdravih životinja, ova razlika nije bila statistički značajna. Koncentracija ukupnog i HDL holesterola je bila značajno niža kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 u odnosu na zdrave životinje, dok se koncentracija LDL holesterola nije značajno razlikovala. Koncentracije serumskih lipida kod zdravih životinja tretiranih melatoninom ili metforminom nisu bile značajno različite u odnosu na koncentracije kod zdravih netretiranih životinja.

Životinje sa dijabetesom melitusom tip 2 tretirane melatoninom su u ovom istraživanju imale niže koncentracije triglicerida i više koncentracije ukupnog i HDL holesterola u odnosu na netretirane životinje. Sniženje koncentracije triglicerida, kao efekat terapije melatoninom, već je pokazano na dva različita modela metaboličkog sindroma (Agil i sar., 2011; Ríos-Lugo i sar., 2010). Obe studije su podrazumevale oralnu administraciju melatonina u dužem trajanju i dozama koje su značajno više u odnosu na onu primenjenu u ovoj studiji. Rezultati istraživanja predstavljenog u ovoj disertaciji ukazuju da terapija melatoninom u trajanju od dve nedelje dovodi do sniženja koncentracije triglicerida u modelu dijabetesa melitusa tip 2 izazvanim streptozotocin-

nikotinamidom. Agil i sar. (2011) su takođe pokazali da melatonin dovodi do povišenja koncentracije HDL holesterola što je u skadu sa rezultatima ovog istraživanja. Za razliku od rezultata ovde predstavljenog istraživanja ova grupa autora je zabeležila i sniženje koncentracije LDL holesterola kod tretiranih životinja, ali ne i efekat na koncentraciju ukupnog holesterola.

Metformin u dozi od 100 mg/kg telesne mase u ovom istraživanju nije ostvario značajne efekte na koncentraciju serumskih lipida. Predstavljeni rezultati saglasni su sa prethodno objavljenim rezultatima, koji se odnose na efekte dvostruko niže doze metformina na nivo serumskih lipida kod pacova da dijabetesom melitusom tip 1 izazvanim primenom streptozotocina (Nam i sar., 2018).

5.3. Analiza koncentracije melatonina u serumu eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2

Koncentracija melatonina u serumu pokazuje pravilne promene u 24-časovnom periodu, sa pikom u periodu noći i niskim vrednostima u toku dana. Koncentracija melatonina takođe podleže sezonskim promenama, sa niskim vrednostima u toku leta i visokim u toku zime. Sem toga, koncentracija melatonina u serumu opada sa starenjem, što je pokazano kod ljudi i životinja. Ove varijacije u koncentraciji se moraju uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata.

Melatonin može posredstvom više različitih mehanizama uticati na metabolizam glukoze. Koncentracija serumskog melatonina u dijabetesu melitusu je najčešće izmenjena. Niske vrednosti serumskog melatonina su nezavisno udružene sa povećanim rizikom za nastanak dijabetesa melitusa tip 2 kod ljudi (McMullan i sar., 2013).

Snižene vrednosti melatonina u serumu su utvrđene kod ljudi obolelih od dijabetesa melitusa tip 1 (Amaral i sar., 2014) i tip 2 (Mäntele i sar., 2012). Brojne studije su pokazale sniženu sintezu melatonina u pinealnoj žlezdi (Frese i sar., 2009; Peschke i sar., 2006) i retini (do Carmo Buonfiglio i sar., 2011), kod različitih animalnih modela dijabetesa melitusa, ali i kod ljudi obolelih od dijabetesa (Peschke i sar., 2006).

Ovim istraživanjem utvrđeno je da su koncentracije melatonina u serumu bile niže kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2 izazvanim streptozotocin-nikotinamidom. Oralna administracija melatonina u dozi od 2 µg/ml prouzrokovala je povišenje koncentracije melatonina u tretiranim grupama, u odnosu na odgovarajuću

kontrolnu grupu. S obzirom na način aplikovanja melatonina, možemo smatrati da su životinje veći deo melatonina unosile u toku tamne faze, kada se melatonin inače sintetise, jer u tom periodu inače normalno konzumiraju hranu i vodu (Rowland, 2007). Doza melatonina od 2 µg/ml, dovela je do statistički značajnog povišenja koncentracije melatonina u serumu, koje je po vrednosti bilo blisko fiziološkim vrednostima izmerenim kod zdravih životinja. Rios Lugo i sar. (2010) su, za razliku od ovih rezultata, aplikovanjem doze od 25 µg/ml na isti način, izazvali višestruki porast koncentracije melatonina u serumu eksperimentalnih životinja. Životinje iz eksperimenta predstavljenog u ovoj doktorskoj disertaciji su u trenutku žrtvovanja bile približne starosti kao životinje iz istraživanja predstavljene u ovoj disertaciji (15-16 nedelja).

Snižena serumska koncentracija melatonina, kao posledica smanjene sinteze u dijabetesu melitusu može se objasniti na više načina. Amaral i sar. (2014) su pokazali da visoka koncentracija glukoze lokalno dovodi do snižene sinteze melatonina kod pacova i miševa *in vitro* i *in vivo*. Sem toga pokazali su i negativnu korelaciju između koncentracije sulfatoksimeletonina u urinu, koja predstavlja odraz koncentracije melatonina u krvi i glikemije (Amaral i sar., 2014). Frese i sar. (2009) su pokazali da su koncentracije mRNA za enzime koje učestvuju u sintezi melatonina (AANAT i HIOMT) u pinealnoj žlezdi dijabetičnih životinja niže u odnosu na koncentracije kod zdravih životinja. Ista grupa autora je pokazala da su koncentracije svih prekursora melatonina, posebno 5-OH triptofana, ali i samog melatonina, snižene u pinealnoj žlezdi dijabetičnih životinja (Frese i sar., 2009). Pošto je za sintezu 5-OH triptofana iz triptofana neophodan tetrahidrobiopteridin kao koenzim, može biti od značaja činjenica da u dijabetesu on podleže oksidaciji pri čemu prelazi u 7,8-dihidrobiopteridin i gubi svoju fiziološku aktivnost (Abudukadier i sar., 2013), čime bi se moglo objasniti sniženje sinteze melatonina u pinealnoj žlezdi. Ekspresiju gena za AANAT, kao i sintezu njegovog prekursora N-acetil serotonina inhibira TNF-α (Fernandes i sar., 2006; Pontes i sar., 2007), što takođe može biti objašnjenje za sniženu sintezu melatonina u dijabetesu melitusu tip 2. Sem smanjene sinteze, sniženju serumske koncentracije melatonina može doprineti i povećano preuzimanje od strane ćelija izloženih oksidativnom stresu (Reiter i sar., 2017)

5.4. Analiza efekata primene melatonina na koncentracije pokazatelja oksidativnog oštećenja u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2

Hiperglikemija je najznačajniji faktor koji u mitohondrijama retine dovodi do povećanog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika, do mitohondrijalne disfunkcije i pada potencijala mitohondrijalne membrane, što smanjuje proizvodnju ATP-a i povećava propustljivost membrane za Bax i citohrom c čiji prolazak u citoplazmu inicira apoptozu (Kowluru i Abbas, 2003; Madsen-Bouterse i Kowluru, 2008). Stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika u dijabetesu dodatno doprinosi povećana ekspresija NADPH oksidaze (Al-Shabrawey i sar., 2008). Značaj NADPH oksidaze kao izvora RVK u retini pokazuje činjenica da inhibicija aktivnosti ovog enzima u retini dovodi do smanjenja ekspresije VEGF-a, na taj način ostvarujući efekat na integritet krvno-retinalne barijere i neoangiogenezu (Al-Shabrawey i sar., 2005).

Povišena koncentracija RVK može povećati aktivaciju transkripcionog faktora NF- κ B i posledično dovesti do povećane produkcije proinflamatornih citokina i azot-monoksida posredstvom povećanja sinteze i aktivacije enzima iNOS (Morgan i Liu, 2011).

Ekspresija gena za enzim iNOS, koji generiše visoke koncentracije NO i doprinosi nastanku oksidativnog oštećenja, povećava pod dejstvom TNF- α i INF- γ (Das, 2017). Fiziološke koncentracije NO izazivaju vazodilataciju, sprečavaju agregaciju trombocita i adheziju leukocita na zid postkapilarnih venula (leukostaza). Visoke koncentracije NO koje generiše iNOS, nasuprot tome, dovode do stvaranja peroksinitritnog anjona, stimulišu nastanak oksidativnog oštećenja makromolekula i ćelijskih struktura i deluju proinflamatorno (Das, 2017).

Pored povećane produkcije RVK, u dijabetesu melitusu, smanjene su aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze, katalaze, glutation reduktaze i glutation peroksidaze (Kowluru i sar., 2001), kao i koncentracije endogenih antioksidanasa kao što je glutation (Jiang i sar., 2016). Ove promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i koncentraciji glutationa smanjuju sposobnost retine da se štiti od štetnog dejstva RVK.

Retina u poređenju sa drugim tkivima ima najbrže preuzimanje kiseonika iz cirkulacije i najintenzivniju oksidaciju glukoze, što je pored činjenice da ima visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, čini jako podložnom oksidativnom oštećenju pod dejstvom RVK (Kowluru i Chan, 2007). Koncentracije superoksida (Du i sar., 2003) i vodonik-peroksida (Ellis i sar., 2000) su povišene u retini dijabetičnih pacova. Pored toga markeri lipidne peroksidacije (TBARS, MDA) (Özdemir i sar., 2014; Salido i sar., 2013) i oksidativnog oštećenja proteina (AOPP) su takođe povišeni u retini u dijabetesu melitusu, čemu u prilog govore i rezultati ovde predstavljenog istraživanja. Povišene koncentracije AOPP su prethodno nađene u serumu i homogenatu jetre dijabetičnih pacova (Aydın i sar., 2017), a ovde predstavljeni rezultati ukazuju da su povišene i u retini. Koncentracije TBARS, MDA i AOPP u serumu su udružene sa povećanim rizikom za nastanak dijabetesne retinopatije kod ljudi, pa prema tome mogu imati prediktivnu vrednost (Al-Shabrawey i Smith, 2010). Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji ukazuju da je koncentracija enzima iNOS povišena u retini kod pacova sa dijabetesom tipa 2, najverovatnije kao posledica povišene koncentracije RVK u retini što je u skladu sa podacima iz literature (Mishra i Newman, 2010; Zheng i sar., 2007)

Procena oksidativnog oštećenja u retini, u ovom istraživanju, izvršena je ispitivanjem nivoa lipidne peroksidacije i oksidativne modifikacije proteina, koja je izražena kroz koncentraciju TBARS i AOPP. Grupa dijabetičnih pacova tretiranih melatoninom u ovom istraživanju imala je niže vrednosti TBARS i AOPP u odnosu na odgovarajuću netretiranu grupu. Sniženje koncentracije TBARS ili MDA, kao pokazatelj intenziteta procesa lipidne peroksidacije, u retini je utvrđeno pri oralnom, subkutanom i intraperitonealnom aplikovanju melatonina kod eksperimentalnih životinja (Mehrzadi i sar., 2018; Özdemir i sar., 2014; Salido i sar., 2013). Prema trenutno dostupnoj literaturi, nema podataka koji bi ukazivali na efekte melatonina na koncentraciju proizvoda uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) u retini eksperimentalnih životinja ili ljudi. Melatonin verovatno ostvaruje svoje antioksidativne efekte delujući direktno na uklanjanje slobodnih radikala i indirektno ostvarujući dejstvo na sintezu antioksidativnih enzima posredstvom Nrf2/ARE elementa (Hristova i sar., 2015; Shah i sar., 2017).

Ovim istraživanjem takođe je utvrđeno da melatonin snižava koncentraciju enzima iNOS u retini uključenog u stvaranje azot-monoksida i toksičnog

peroksinitritnog anjona. Smanjenu ekspresiju gena za iNOS pod dejstvom melatonina u retini dijabetičnih pacova utvrdili su Jiang i sar. (2016). Oni su potvrdili da je sniženje ekspresije gena za iNOS najverovantnije posredovano signalnim putem koji uključuje NF- κ B (Jiang i sar., 2016). Postojanje jake pozitivne korelacije melatonina u serumu i koncentracija TBARS, AOPP i iNOS ukazuje na značaj antioksidativnih efekata melatonina za zaštitu od oksidativnog oštećenja u retini.

Za razliku od melatonina, metformin u dozi od 100 mg/kg, nije ostvario značajne efekte ni na parametre oksidativnog oštećenja, ni na koncentraciju iNOS u retini. Sniženje koncentracije TBARS pod dejstvom metformina u dozi od 300 mg/kg je utvrđeno u srcu, ali ne i bubrežima spontano hipertenzivnih pacova (Malínská i sar., 2016). Ista doza metformina je dovela do smajenja ekspresije iNOS u plućima gojaznih pacova (Calixto i sar., 2013). Izostanak efekta metformina na ispitivane parametre u ovoj studiji se može objasniti razlikom u dozi ili specifičnošću dejstva metformina na ispitivani organ.

5.5. Analiza efekata primene melatonina na koncentraciju medijatora inflamacije u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2

Inflamacija predstavlja odbrambeni odgovor imunog sistema na neki antigen ili mikroorganizam. Za razliku od akutne inflamacije čiji su efekti na tkivo povoljni i rezultuju reparacijom, hronična inflamacija dovodi do oštećenja tkiva i ćelijske smrti (Hotamisligil, 2006). U oštećenom tkivu "Toll-like" receptori prepoznaju endogene stres signale, molekularne obrasce oštećenja (DAMPs) i njihova interakcija aktivira signalne puteve NF- κ B i MAPK koji povećavaju ekspresiju proinflamatornih citokina uključujući i TNF- α (Dehdashtian i sar., 2018).

Inflamacija ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji dijabetesne retinopatije. Povezanost inflamacije i endotelne disfunkcije je utvrđena kod obolelih od tip 2 dijabetesa (van Hecke i sar., 2005). Inicijalni okidač inflamatornog odgovora u retini su oštećenja makromolekula i ćelijskih struktura nastala pod dejstvom RVK i/ili RVA, čije je stvaranje povećano u uslovima hiperglikemije (Kowluru i Chan, 2007). Nakon iniciranja imunog odgovora oksidativnim oštećenjem u retini, proces dalje progredira

pod dejstvom proinflammatoryh citokina (TNF- α), adhezionih molekula (sICAM-1, VCAM), faktora rasta (VEGF) i azot-monoksid produkujućih enzima (iNOS) (Tarr i sar., 2013).

Sistemska inflamacija ima veliki značaj za patogenezu dijabetesa melitusa tip 2 i njegovih komplikacija. Povišene vrednosti proinflammatoryh citokina, kao što su TNF- α , IL-6, rezistin i proteina akutne faze (CRP) su pronađene u krvi obolelih od dijabetesa melitusa tip 2 (Das, 2017). Utvrđeno je da koncentracija TNF- α i drugih proinflammatoryh molekula u cirkulaciji korelira sa težinom dijabetesne retinopatije (Doganay i sar., 2002; Nalini. i sar., 2017). Endotelna disfunkcija, proinflammatory i adhezioni molekuli su ključni faktori potrebni za nastanak leukostaze verovatno pojačavajući interakcije između leukocita i endotelnih ćelija (Joussen i sar., 2004).

Leukostaza, odnosno adheriranje leukocita na zid retinalnih kapilara, je proces od velikog značaja za patogenezu dijabetesne retinopatije, jer pored fizičke okluzije kapilara i posledične ishemije u retini, leukociti doprinose oksidativnom oštećenju ćelija kapilara, produkcijom RVK i inflamaciji, sekrecijom citokina i faktora rasta (Tarr i sar., 2013). Oštećenje retinalnih krvnih sudova i strukture tesnih spojeva za posledicu ima narušavanje integriteta krvno-retinalne barijere što se smatra ključnim trenutkom u patogenezi dijabetesne retinopatije (Dehdashtian i sar., 2018). Najznačajnijim proinflammatoryh molekulima uključenim u patogenezu dijabetesne retinopatije smatraju se TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, sICAM-1, VCAM-1, integrin β -2 (CD-18) i protein hemoatraktant monocita (engl. monocyte chemoattractant protein MCP-1) (Roy i sar., 2017).

U uslovima hiperglikemije, pored leukocita, proinflammatoryh molekule sintetišu i ćelije retine, pre svega Milerove ćelije (Du i sar., 2004; Liu i sar., 2014) i aktivisane mikroglije (Altmann i Schmidt, 2018). Aktivacija mikroglija uslovljava njihovu proliferaciju i migraciju, što dovodi do narušavanja funkcije i gubitka retinalnih neurona, što se manifestuje istanjenjem sloja nervnih vlakana i oštećenjem vida. (Altmann i Schmidt, 2018).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su povišenu koncentraciju TNF- α u serumu životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, u odnosu na zdrave životinje, što je u skladu sa rezultatima dobijenim na sličnom eksperimentalnom modelu (Palsamy i Subramanian, 2011, 2010). Povišene vrednosti proinflammatoryh citokina među kojima

je i TNF- α su pronađene u krvi obolelih od dijabetesa tipa 2 (Das, 2017). Povišena koncentracija TNF- α u cirkulaciji povezana je sa razvojem dijabetesne retinopatije (Yao i sar., 2018). Utvrđeno je da koncentracija TNF- α u cirkulaciji korelira sa težinom dijabetesne retinopatije (Nalini. i sar., 2017). Pored povišene koncentracije u cirkulaciji, povišene vrednosti TNF- α nađene su u očnoj vodici negojaznih dijabetičnih miševa (Mugisho i sar., 2018) i očnoj vodici dijabetičara (Feng i sar., 2018) koji su razvili retinopatiju. Faktor nekroze tumora- α se sintetise u adipocitima i/ili perifernim tkivima (Fasshauer i Paschke, 2003) i izaziva tkivnu inflamaciju posredstvom efekta na proizvodnju RVK ili aktivacijom signalnih puteva u ćelijama, pre svega posredstvom JNK i NF- κ B (Akash i sar., 2018). TNF- α smanjuje ekspresiju glukoznog transpotera tipa 4 (GLUT4) i povećava serin fosforilaciju insulin receptor supstrata (engl. insulin receptor supstrat-IRS) (Rui i sar., 2001) čime doprinosi nastanku insulinske rezistencije (Hotamisligil, 1999), uslovljavajući hiperglikemiju, koja pokreće mehanizme oštećenja retine i dovodi do iniciranja ili progresije dijabetesne retinopatije. Povišene vrednosti TNF- α mogu da prouzrokuju endotelnu disfunkciju, delujući na produkciju RVK, konkretno superoksida u neutrofilima i smanjenjem koncentracije NO u endotelu krvnih sudova (Das, 2017).

U endotelu TNF- α takođe stimuliše stvaranje adhezionih molekula, kao sto je sICAM-1 koji imaju značaj u nastanku leukostaze (Thichanpiang i Wongprasert, 2015). Ovaj molekul zajedno sa hiperglikemijom povećava aktivnost enzima β -(1,3) galaktozil O-glikozilglikoprotein β -(1,6)-N-acetil glukozaminil transferaze (C2GNT) koji dovodi do O-glikozilacije površinskih ugljenohidratnih lanaca leukocita, čime doprinosi nastanku leukostaze (Ben-Mahmud i sar., 2004). Faktor nekroze tumora- α samostalno ili u kombinaciji sa IL-1 β ili VEGF-om povećava propustljivost krvno-retinalne barijere *in vitro*, mehanizmom koji podrazumeva snižavanje cAMP-a u ćeliji (van der Wijk i sar., 2017). Sa druge strane, mehanizmom posredovanim NF- κ B, TNF- α smanjuje ekspresiju gena za klaudin 5 i protein ZO-1, što narušava integritet tesnih spojeva i povećava propustljivost endotelnih ćelija (Aveleira i sar., 2010). Povećanje propustljivosti krvno-retinalne barijere navedenim mehanizmom posredovano je protein kinazom C (Lin i sar., 2018; Titchenell i sar., 2012). Opisani efekti TNF- α mogu biti od velikog značaja za nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije, jer mogu posredovati u

nastanku leukostaze i posledičnom narušavanju integriteta krvno-retinalne barijere (Huang i sar., 2011).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da oralno administriranje melatonina dovodi do sniženja serumske koncentracije TNF- α kod životinja sa dijabetesom melitusom tip 2. Sniženje serumske koncentracije TNF- α , zabeleženo je kod pacova sa tipom 2 dijabetesa (Agil i sar., 2013) i kod gojaznih ljudi sa insulinskom rezistencijom (Sun i sar., 2018). Smanjenje serumske koncentracije TNF- α , najverovatnije nastaje kao posledica inhibicije signalnog puta NF- κ B (Jiang i sar., 2016), kojim je regulisana sinteza ovog proinflamatornog citokina. Sem efekta na serumsku koncentraciju TNF- α , melatonin snižava i koncentraciju ovog citokina i u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 (Jiang i sar., 2016; Salido i sar., 2013). Intraperitonealna ili intravitrealna primena anti TNF- α antitela, dovodi do značajnog smanjenja leukostaze, apoptoze i broja acelularnih kapilara (Wen Li i sar., 2014).

Ovo istraživanje je ukazalo da metformin, takođe dovodi do snižavanja serumske koncentracije TNF- α . Efekat sniženja koncentracije TNF- α , pod dejstvom metformina, zabeležen je u kulturi monocita stimulisanih lipopolisaharidom (Bułdak i sar., 2016) i u krvi kod obolelih od dijabetesa melitusa tip 2 (Andrews i sar., 2012). Ovaj efekat metformina je takođe utvrđen i u ćelijama retinalnog pigmentog epitela, kao i u retini dijabetičnih pacova (Han i sar., 2018). Pri tom je utvrđeno, da metformin svoje dejstvo ostvaruje inhibicijom signalnih puteva NF- κ B i MAPK (Bułdak i sar., 2016).

“Hoorn” studija je utvrdila pozitivnu asocijaciju prevalencije dijabetesne retinopatije sa povišenom serumskom koncentracijom sICAM (van Hecke i sar., 2005). Ovaj molekul predstavlja solubilnu formu interćelijskog adhezionog molekula koja omogućava adheziju leukocita i njihovu migraciju kroz endotel vezivanjem za leukocitne integrine LFA-1 (CD11a/CD18) i Mac-1 (CD11b/CD18) (Noda i sar., 2012; Witkowska i Borawska, 2004). Ekspimiranje sICAM-1 je povećano u retini i horoidnom pleksusu obolelih od dijabetesa melitusa i njegova ekspresija korelira sa brojem neutrofila koji migriraju kroz endotel krvnih sudova (McLeod i sar., 1995). Inhibicija sICAM-1 specifičnim antitelom, sprečava leukostazu i oštećenje krvno-retinalne barijere dijabetičnih životinja (Miyamoto i sar., 1999), što ukazuje na značaj sICAM-1 u patogenezi dijabetesne retinopatije. Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji

ukazuju da je koncentracija sICAM-1 povišena u retini životinja sa dijabetesom tipa 2, što je u skladu sa dostupnim rezultatima *in vitro* eksperimentalnih studija (Xie i sar., 2014).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da ni melatonin, ni metformin nisu ostvarili značajne efekte na koncentraciju sICAM-1 u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2. Za razliku od ovih rezultata, Xie i sar. (2014) su pokazali da melatonin snižava ekspresiju i sintezu sICAM-1 u ćelijama retinalnog pigmentnog epitela i ćelijama retinalnih endotelnih ćelija izloženim visokoj koncentraciji glukoze i interleukinu 1 β . Pošto u dostupnoj literaturi ima malo podataka o efektu melatonina na ovaj parametar, potrebna su dodatna istraživanja, u cilju utvrđivanja efekta melatonina na sICAM-1 kako *in vivo* tako i *in vitro*. Sniženje sinteze sICAM-1 pod dejstvom metformina je takođe utvrđeno *in vitro* u kulturi endotelnih ćelija retine, pri čemu u sniženju posreduje AMPK (Han i sar., 2018)

5.6. Analiza efekata primene melatonina na medijatore oštećenja krvno-retinalne barijere i neoangiogeneze u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2

Inflamacija i proinflamatorni citokini, kao i pojedini faktori rasta mogu dovesti do promena propustljivosti retinalnih krvnih sudova, koje je karakteristika mnogih oboljenja oka, uključujući i dijabetesnu retinopatiju (Klaassen i sar., 2013). Najznačajniji efekat na propustljivost krvno-retinalne barijere, pored TNF- α , ostvaruje VEGF. Ovaj molekul deluje posredstvom protein kinaze C (PKC), koja fosforiliše okludin, pri čemu ova modifikacija izaziva njegovu ubikvitinaciju i internalizaciju, što zbog narušavanja integriteta tesnih spojeva dovodi do povećanja propustljivosti krvno- retinalne barijere (Murakami i sar., 2012, 2009).

Angiogeneza se definiše kao rast novih krvnih sudova iz postojećih i predstavlja kompleksan proces koji uključuje proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, ekstracelularnu proteolizu kao i formiranje i remodelovanje novih krvnih sudova (Beck i D'Amore, 1997). Glavni faktor odgovoran za neovaskularizaciju i povećanje propustljivosti krvnih sudova u retini je VEGF (El Rami i sar., 2017; Gupta i sar., 2013; Kowluru i Chan, 2007; Tarr i sar., 2013). Matriks metaloproteinaza 9 takođe predstavlja

značajan proangiogeni faktor koji deluje sinergistički sa VEGF-om (Ebrahim i sar., 2010; Kowluru, 2010; Kowluru i sar., 2012).

Vaskularni endotelni faktor rasta se sintetiše u odgovoru na ishemiju/hipoksiju, pri čemu je njegova sinteza regulisana posredstvom DNK vezujućeg proteina, HIF-1. Ovaj faktor stimuliše ekspresiju gena za VEGF (Zhang i sar., 2018). Pored hipoksije i hiperglikemija i oksidativni stres izazivaju povećano eksprimiranje VEGF-a, što je pokazano *in vitro* na ćelijama retinalnog pigmentnog epitela (Marazita i sar., 2016; Sone i sar., 1996). Hiperglikemija verovatno dovodi do povećane sinteze VEGF-a posredno, mehanizmom koji uključuje efekat povećane koncentracije uznapredovalih produkata glikacije (AGE) na sintezu HIF-1 (Lu i sar., 1998; Treins i sar., 2001). Iako se VEGF sintetiše u gotovo svim ćelijama retine, smatra se da su Milerove ćelije mesto sinteze VEGF-a odgovornog za oštećenje krvno-retinalne barijere i neovaskularizaciju (Bai i sar., 2009; Wang i sar., 2015). U retini, VEGF stimuliše neoangiogenezu, utičući na proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, pri čemu efekte ostvaruje aktivacijom VEGFR2 receptora (Shibuya, 2006). Ovi receptori pokreću puteve intracelijske signalizacije aktivacijom mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), fosfatidilinozitol 3-kinaze/Akt i protein kinaze C (Penn i sar., 2008). Vaskularni endotelni faktor rasta, sem toga, povećava ekspresiju sICAM-1 *in vivo*, čime doprinosi leukostazi i inflamaciji u retini (Lu i sar., 1999).

Povećanje koncentracije VEGF-a u retini ili očnoj vodici je registrovano kod životinja (Jiang i sar., 2016; Özdemiir i sar., 2014; Salido i sar., 2013) i ljudi (Lutty i sar., 1996; Wang i sar., 2014) obolelih od dijabetesa, što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Naročito visoke vrednosti VEGF-a u očnoj vodici marker su proliferativne dijabetesne retinopatije i mogu imati prognostički značaj (Wang i sar., 2014).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da melatonin dovodi do snižavanja koncentracije VEGF u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2. Smanjena sinteza VEGF u uslovima hiperglikemije, kao efekat tretmana melatoninom, je utvrđena u Milerovim ćelijama pacova (Jiang i sar., 2012) i humanim retinalnim endotelnim i pigmentnim epitelnim ćelijama (Xie i sar., 2014). Sem toga sniženje koncentracije VEGF-a u retini, pod dejstvom melatonina utvrđeno je i *in vivo*, nakon intraperitonealne aplikacije melatonina (Özdemiir i sar., 2014; Salido i sar., 2013). Efekat melatonina na koncentraciju VEGF-a je najverovatnije posredovan inhibitornim efektom melatonina

na sintezu HIF1 u retini (Xu i sar., 2018), pri čemu je ovaj efekat najverovatnije posredovan Sirt1 zavisnim mehanizmom (Lim i sar., 2010). Sniženje koncentracije VEGF-a koje nastaje u toku terapije melatoninom ima veliki značaj za očuvanje integriteta i smanjenje propustljivosti krvno-retinalne barijere (Kaur i sar., 2008; Mehrzadi i sar., 2018) što je od potencijalno velikog značaja u terapiji i prevenciji dijabetesne retinopatije.

Prema rezultatima ovog istraživanja, metformin u dozi od 100 mg/kg nije ostvario značajne efekte na koncentraciju VEGF-a u retini. Izostanak efekta metformina na koncentraciju VEGF ipak ne isključuje njegov protektivni efekat, jer je utvrđeno da metformin ostvaruje inhibitorno dejstvo na razvoj dijabetesne retinopatije dovodeći do alternativnog splajsinga VEGF molekula, čime smanjuje aktivaciju VEGFR2 (Yi i sar., 2016).

Matriks metaloproteinaza 9, pored razgradnje proteina ekstracelularnog matriksa i bazalne membrane, kojim omogućava migraciju endotelih ćelija u procesu neoangiogeneze, omogućava oslobađanje matriks vezanog VEGF-a, čime potencira njegovo dejstvo, povećavajući bioraspoloživost (Di i sar., 2016; Ebrahim i sar., 2010). Matriks metaloproteinaze su jako osetljive na efekte oksidativnog stresa, pri čemu RVK i RVA povećavaju njihovu aktivnost direktnom oksidacijom ostataka cisteina u pro-domenu (Nelson i Melendez, 2004; Okamoto i sar., 2004). Aktivno mesto ovog enzima sadrži atom cinka za koji se normalno vezuje cistein iz pro-domena, čineći enzim inaktivnim, dok oksidacija cisteina u prooksidativnim uslovima uslovljava porast aktivnosti (Rosenberg, 2009; Yabluchanskiy i sar., 2013). Oksidativni stres ima stimulišući efekat na ekspresiju gena za MMP-9 posredstvom metilacije promotora gena za MMP-9 (Kowluru i Shan, 2017). Povećanje aktivnosti MMP-9 u dijabetesu može dodatno biti posredovano citokinima i faktorima rasta među kojima je i TNF- α (Lee i sar., 2010; Van den Steen i sar., 2002). Sinteza MMP-9 regulisana je transkripcionim faktorima NF- κ B i aktivator proteina 1 (AP1) koji se vezuju za promotor gena za MMP-9, pri čemu u vezivanju posreduje enzim PARP-1 (Mishra i Kowluru, 2017). Činjenica da NF- κ B povećava ekspresiju gena za MMP-9 (Kim i sar., 2007; Mishra i Kowluru, 2017), ukazuje na proinflamatornu prirodu ovog enzima. Povećana sinteza MMP-9 u dijabetesu melitusu objašnjava se acetilacijom aktivator

proteina 1 (AP1) i/ili PARP-1, koja nastaje kao posledica smanjene aktivnosti Sirt1 deacetilaze (Mishra i sar., 2016; Mishra i Kowluru, 2017).

Matriks metaloproteinaza 9 ispoljava proapoptotičko dejstvo na ćelije retine, najverovatnije posredujući u oštećenju membrane mitohondrija (Chen i sar., 2015; Kowluru i Shan, 2017). Inhibicija MMP-9 dovodi do povećanog preživljavanja čepića u eksperimentalnom modelu *retinitis pigmentosa* (Shin i sar., 2016). Sem toga MMP-9 uslovljava apoptozu endotelnih ćelija retine *in vitro* (Mohammad i Kowluru, 2012). Povećanje aktivnosti MMP-9 može biti posledica oksidativnog stresa ili dejstva proinflamatornih medijatora TNF- α i NF- κ B (Brown i sar., 2007; Rosenberg, 2009). Reaktivne vrste azota i azot-monoksid takođe predstavljaju potentne aktivatore matriks metaloproteinaza (Okamoto i sar., 2004).

Povećanje koncentracije MMP-9 *in vitro* u uslovima hiperglikemije je pokazano na ćelijama retinalnog pigmentnog epitela (Xie i sar., 2014) i ćelijama retinalnih kapilara (Kowluru, 2010). Rezultati predstavljani u ovoj disertaciji govore u prilog povećanju koncentracije MMP-9 u retini *in vivo*, koja je utvrđena ovim istraživanjem. Povišene koncentracije MMP-9 su nađene u serumu obolelih od dijabetesne retinopatije, pri čemu koncentracije koreliraju sa težinom bolesti (Jayashree i sar., 2018)

Terapija melatoninom je, prema rezultatima ovog istraživanja dovela do sniženja koncentracije MMP-9 u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2. Sniženje koncentracije i sinteze MMP-9, u toku terapije melatoninom utvrđeno je *in vitro* u kulturi endotelnih ćelija retine i ćelijama retinalnog pigmentnog epitela (Xie i sar., 2014). Efekat melatonina na sintezu MMP-9 najverovatnije je posredovan Sirt1 zavisnim mehanizmom (Kowluru i sar., 2014; Mayo i sar., 2017; Shah i sar., 2017).

Činjenica da je korelacionom analizom utvrđena linearna veza koncentracije melatonina i parametra oksidativnog oštećenja TBARS i AOPP, kao i linearna veza koncentracije melatonina i enzima iNOS, ali ne i linearna veza koncentracije melatonina i koncentracije VEGF-a i MMP-9 ukazuje da su dejstva na koncentracije VEGF i MMP-9 verovatno posredovana efektom na stepen oksidativnog oštećenja u retini.

Metformin, prema rezultatima ovog istraživanja, takođe dovodi do smanjenja koncentracije MMP-9 u retini. Sličan efekat metformina na koncentraciju MMP-9 utvrđen je *in vitro* u kulturi endotelnih progenitornih ćelija (Li i sar., 2017) i kulturi

MCS-7 ćelija karcinoma dojke (Jang i sar., 2014) i *in vivo* kod pacova na modelu periodontitisa (Araújo i sar., 2017). Pri tom je ovaj efekat metformina verovatno posredovan AMPK/mTOR/autofagija signalnim putem (Li i sar., 2017).

5.7. Analiza efekata melatonina na koncentraciju kaspaze-3 u retini eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2

Ćelijska smrt se smatra značajnom za nastanak tipičnih morfoloških karakteristika dijabetesne retinopatije poput mikroaneurizmi, acelularnih kapilara i gubitka pericita, kao i narušavanja barijerne funkcije krvno-retinalne barijere (Feenstra i sar., 2013). Mehanizmi ćelijske smrti koji se smatraju značajnim za patogenezu dijabetesne retinopatije su apoptoza i piroptoza (Crooke i sar., 2017).

Apoptoza je najviše proučavani tip ćelijske smrti u dijabetesnoj retinopatiji. Postojanje apoptoze endotelnih, nervnih ćelija i pericita u retini je najčešće detektovano upotrebom TUNEL eseja kod dijabetičnih i galaktozemičnih pacova i ljudi obolelih od dijabetesa melitusa (Barber i sar., 2011; Mizutani i sar., 1996). Povećana aktivnost kaspaza koja govori u prilog postojanja apoptoze je takođe utvrđena u retini galaktozemičnih i dijabetičnih pacova i retini ljudi obolelih od dijabetesa (Mohr i sar., 2002). Porast aktivnosti inflamatornih kaspaza, uključujući i kaspazu-1, registrovan je vrlo rano nakon povišenja koncentracije heksoza u krvi, dok je koncentracija takozvanih izvršnih kaspaza u koje spada kaspaza-3, bila povišena nakon nekoliko meseci evolucije bolesti u vreme kada se pojavljuju morfološke promene na krvnim sudovima karakteristične za dijabetesnu retinopatiju (Mohr i sar., 2002). Utvrđeno je da inhibicija kaspaze-1 sprečava degeneraciju retinalnih krvnih sudova u galaktozemiji i dijabetesu melitusu (Vincent i Mohr, 2007), što ukazuje na značaj mehanizma piroptoze u patogenezi dijabetesne retinopatije. Nasuprot tome, porast koncentracije kaspaze-3 kod dijabetičnih pacova je registrovan nakon samo dve nedelje hiperglikemije (Jousen i sar., 2009). Porast aktivnosti kaspaze-3 je prethodno registrovan *in vitro* u kulturi ćelija retinalnog pigmentnog epitela, Milerovih ćelija i pericita u uslovima hiperglikemije (Busik i sar., 2008; Devi i sar., 2013).

Ovim istraživanjem, ipak nije utvrđeno povećanje koncentracije kaspaze 3 u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2, šest nedelja nakon uspostavljanja

hiperglikemije. Ovi rezultati prema tome ukazuju da mehanizmi ćelijske smrti koji uključuju kaspazu-3, verovatno nisu dominantni u ranoj fazi progresije dijabetesne retinopatije. Ovim istraživanjem, ipak, utvrđene su povišene koncentracije MMP-9 u retini i TNF- α u serumu, što može biti od značaja za sagledavanje procesa apoptoze u sklopu dijabetesne retinopatije.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajne efekte melatonina na koncentraciju kaspaze-3 u retini nakon dvonedeljne terapije. Za razliku od rezultata predstavljenih u ovoj disertaciji, nakon terapije u trajanju od 12 nedelja, melatonin je doveo do značajnog sniženja kaspaze-3 u retini pacova sa hiperglikemijom (Li i sar., 2013). Razlika u pronađenom efektu, u ovom slučaju, verovatno je posledica dužine trajanja terapije, kao i činjenice da nakon 6 nedelja od uspostavljanja hiperglikemije u retini pacova, u ovde predstavljenom istraživanju, nije utvrđeno povećanje koncentracije kaspaze-3.

Metformin, prema rezultatima ovog istraživanja, takođe nije ostvario značajne efekte na koncentraciju kaspaze-3 u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 nakon dvonedeljne terapije u dozi od 100 mg/kg. Sniženje koncentracije kaspaze-3 u retini dijabetičnih pacova utvrđeno je nakon dvomesečne terapije metforminom u dozi od 350 mg/kg (Nasiry i sar., 2017). Razlike u efektu primenjene terapije se i u ovom slučaju mogu objasniti različitim trajanjem terapije i primenom različitih doza metformina.

6. Zaključak

Na osnovu rezultata ovog istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Retina eksperimentalnih životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, indukovanim streptozotocin-nikotinamidom, karakteriše se povećanim stepenom oksidativnog oštećenja i porastom koncentracija biomarkera inflamacije i neoangiogeneze. Promene u intenzitetu oksidativnog stresa i biomarkera inflamacije su u korelaciji sa sniženjem koncentracije melatonina u serumu.
2. Melatonin dovodi do sniženja koncentracije glukoze, ukupnog i HDL holesterola u krvi, čime ostvaruje preventivno dejstvo na nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije.
3. Melatonin dovodi do sniženja intenziteta lipidne peroksidacije, stepena oksidativne modifikacije proteina i koncentracije enzima iNOS čime smanjuje oksidativno oštećenje tkiva retine u dijabetesu melitusu tip 2.
4. Melatonin ispoljava antiinflamatorni efekat snižavanjem koncentracije proinflamatornog citokina TNF- α u serumu životinja sa dijabetesom melitusom tip 2, ali ne deluje na koncentraciju adhezionog molekula sICAM-1 u retini, uključenog u proces leukostaze.
5. Melatonin deluje protektivno na tkivo retine, snižavanjem koncentracija najvažnijih medijatora oštećenja krvno-retinalne barijere i neoangiogeneze u dijabetesnoj retinopatiji, VEGF-a i MMP-9.
6. Melatonin ostvaruje protektivne efekte na tkivo retine u dijabetesu melitusu, delujući na parametre oksidativnog oštećenja, inflamacije i neoangiogeze. Zbog ostvarenih efekata na najznačajnije patogenetske faktore uključene u nastanak i progresiju dijabetesne retinopatije, melatonin može biti od koristi u prevenciji ili terapiji promena u retini koje se javljaju u dijabetesu melitusu.

7. Literatura

- Abudukadier, A., Fujita, Y., Obara, A., Ohashi, A., Fukushima, T., Sato, Y., Ogura, M., Nakamura, Y., Fujimoto, S., Hosokawa, M., Hasegawa, H., Inagaki, N. (2013). Tetrahydrobiopterin Has a Glucose-Lowering Effect by Suppressing Hepatic Gluconeogenesis in an Endothelial Nitric Oxide Synthase–Dependent Manner in Diabetic Mice. *Diabetes* 62(9), 3033–43. <https://doi.org/10.2337/db12-1242>
- ACCORD Study Group, ACCORD Eye Group, Chew, E., Ambrosius, W., Davis, M., Danis, R., Gangaputra, S., Greven, C., Hubbard, L., Esser, B., Lovato, J., Perdue, L., Jr, G.D., Cushman, W., Ginsberg, H., Elam, M., Genuth, S., Gerstein, H., Schubart, U., Fine, L.J. (2010). Effects of Medical Therapies on Retinopathy Progression in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 363, 233–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001288>
- Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamad, S., El-Mir, M.Y., Vázquez, G.F. (2011). Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* 50(2), 207–12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00830.x>
- Agil, A., Reiter, R.J., Jiménez-Aranda, A., Ibán-Arias, R., Navarro-Alarcón, M., Marchal, J.A., Adem, A., Fernández-Vázquez, G. (2013). Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* 54(4), 381–8. <https://doi.org/10.1111/jpi.12012>
- Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueroa, A., Zen, N., Fernández-Vázquez, G. (2012). Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* 52(2), 203–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00928.x>
- Ahangarpour, A., Heidari, H., Oroojan, A.A., Mirzavandi, F., Nasr Esfehiani, K., Dehghan Mohammadi, Z. (2017). Antidiabetic, hypolipidemic and hepatoprotective effects of *Arctium lappa* root's hydro-alcoholic extract on nicotinamide-streptozotocin induced type 2 model of diabetes in male mice. *Avicenna J. phytomedicine* 7(2), 169–79.

- Aiello, L.P., Clermont, A., Arora, V., Davis, M.D., Sheetz, M.J., Bursell, S.E. (2006). Inhibition of PKC β by Oral Administration of Ruboxistaurin Is Well Tolerated and Ameliorates Diabetes-Induced Retinal Hemodynamic Abnormalities in Patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 86–92. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0757>
- Aiello, L.P., Vignati, L., Sheetz, M.J., Zhi, X., Girach, A., Davis, M.D., Wolka, A.M., Shahri, N., Milton, R.C., PKC-DRS and PKC-DRS2 Study Groups (2011). Oral Protein Kinase C β Inhibition Using Ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C β Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C β Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2. *Retina* 31(10), 2084–94. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3182111669>
- Akash, M.S.H., Rehman, K., Liaqat, A. (2018). Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Cell. Biochem.* 119(1), 105–10. <https://doi.org/10.1002/jcb.26174>
- Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A.B., Ma, G., Matragoon, S., Lemtalsi, T., Caldwell, R.W., Caldwell, R.B. (2008). Role of NADPH Oxidase and Stat3 in Statin-Mediated Protection against Diabetic Retinopathy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 49, 3231–8. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1754>
- Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A.B., Platt, D.H., Matragoon, S., Behzadian, M.A., Caldwell, R.W., Caldwell, R.B. (2005). Inhibition of NAD(P)H Oxidase Activity Blocks Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression and Neovascularization during Ischemic Retinopathy. *Am. J. Pathol.* 167(2), 599–607. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63001-5)
- Al-Shabrawey, M., Smith, S. (2010). Prediction of diabetic retinopathy: Role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers. *EPMA J.* 1(1), 56–72. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0002-9>
- Alonso-Vale, M.I., Andreotti, S., Peres, S.B., Anhê, G.F., das Neves Borges-Silva, C., Neto, J.C., Lima, F.B. (2005). Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am. J. Physiol. Metab.* 288(4), E805–12. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00478.2004>

- Altmann, C., Schmidt, M.H.H. (2018). The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1), 110. <https://doi.org/10.3390/ijms19010110>
- Amaral, F.G., Turati, A.O., Barone, M., Scialfa, J.H., do Carmo Buonfiglio, D., Peres, R., Peliciari-Garcia, R.A., Afeche, S.C., Lima, L., Scavone, C., Bordin, S., Reiter, R.J., Menna-Barreto, L., Cipolla-Neto, J. (2014). Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. *J. Pineal Res.* 57(1), 67–79. <https://doi.org/10.1111/jpi.12144>
- American Academy of Ophthalmology Retina/Vitreous Panel (2017). *Preferred Practice Pattern Guidelines. Diabetic retinopathy.*, San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology. Available at: www.aao.org/ppp. (Accessed: January 20 2019)
- American Diabetes Association (2003). Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabetes Care* 26(suppl 1), s28–s32.
- American Diabetes Association (2017). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 40(suppl 1), S11–S24. <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>
- Andreeva, I., Kožemjakin, A., Kiškun, A. (1988). [Modification of the method of measurement of lipid peroxides in test with thiobarbituric acid]. *Lab. Delo* (11), 41–3.
- Andrews, M., Soto, N., Arredondo, M. (2012). [Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor- α , Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients]. *Rev. Med. Chil.* 140(11), 1377–82. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012001100001>
- Antonetti, D.A., Klein, R., Gardner, T.W. (2012). Diabetic Retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 366(13), 1227–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1005073>
- Araújo, A.A., Pereira, A.S.B.F., Medeiros, C.A.C.X., Brito, G.A.C., Leitão, R.F.C., Araújo, L.S., Guedes, P.M.M., Hiyari, S., Pirih, F.Q., Araújo Júnior, R.F. (2017). Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat

- model of periodontitis. *PLoS One* 12(8), e0183506.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183506>
- Aveleira, C.A., Lin, C.-M., Abcouwer, S.F., Ambrósio, A.F., Antonetti, D.A. (2010). TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes* 59(11), 2872–82.
<https://doi.org/10.2337/db09-1606>
- Aydın, A.F., Bingül, İ., Küçükgergin, C., Doğan-Ekici, I., Doğru Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2017). Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 98(5), 278–88. <https://doi.org/10.1111/iep.12252>
- Bähr, I., Mühlbauer, E., Schucht, H., Peschke, E. (2011). Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J. Pineal Res.* 50(3), 336–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00848.x>
- Bai, Y., Ma, J., Guo, J., Wang, J., Zhu, M., Chen, Y., Le, Y.Z. (2009). Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J. Pathol.* 219(4), 446–54. <https://doi.org/10.1002/path.2611>
- Baker, J.R., Metcalf, P.A., Johnson, R.N., Newman, D., Rietz, P. (1985). Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin. Chem.* 31(9), 1550–54.
- Baker, J.R., Zyzak, D. V, Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1994). Chemistry of the fructosamine assay: D-glucosone is the product of oxidation of Amadori compounds. *Clin. Chem.* 40(10), 1950–55.
- Barber, A.J., Gardner, T.W., Abcouwer, S.F. (2011). The Significance of Vascular and Neural Apoptosis to the Pathology of Diabetic Retinopathy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 52(2), 1156-63. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6293>
- Beck, L., D'Amore, P.A. (1997). Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* 11(5), 365–73.
- Ben-Mahmud, B.M., Mann, G.E., Datti, A., Orlacchio, A., Kohner, E.M., Chibber, R. (2004). Tumor Necrosis Factor- α in Diabetic Plasma Increases the Activity of Core

- 2 GlcNAc-T and Adherence of Human Leukocytes to Retinal Endothelial Cells. *Diabetes* 53(11), 2968–76. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.11.2968>
- Benarroch, E.E. (2008). Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations. *Neurology* 71(8), 594–8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324283.57261.37>
- Birgani, G.A., Ahangarpour, A., Khorsandi, L., Moghaddam, H.F. (2018). Anti-diabetic effect of betulinic acid on streptozotocin- nicotinamide induced diabetic male mouse model. *Braz. J. Pharm. Sci.* 54(2), e17171. <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000217171>
- Bisquert, R., Muñoz-Calvo, S., Guillamón, J.M. (2018). Protective Role of Intracellular Melatonin Against Oxidative Stress and UV Radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 9, 318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00318>
- Bizot-Espiard, J.G., Doublé, A., Guardiola-Lemaitre, B., Delagrangé, P., Ktorza, A., Pénicaud, L. (1998). Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab.* 24(3), 235–40.
- Bouatia-Naji, N., Bonnefond, A., Cavalcanti-Proença, C., Sparsø, T., Holmkvist, J., Marchand, M., Delplanque, J., Lobbens, S., Rocheleau, G., Durand, E., De Graeve, F., Chèvre, J.-C., Borch-Johnsen, K., Hartikainen, A.-L., Ruukonen, A., Tichet, J., Marre, M., Weill, J., Heude, B., Tauber, M., Lemaire, K., Schuit, F., Elliott, P., Jørgensen, T., Charpentier, G., Hadjadj, S., Cauchi, S., Vaxillaire, M., Sladek, R., Visvikis-Siest, S., Balkau, B., Lévy-Marchal, C., Pattou, F., Meyre, D., Blakemore, A.I.F., Jarvelin, M.-R., Walley, A.J., Hansen, T., Dina, C., Pedersen, O., Froguel, P. (2009). A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 41(1), 89–94. <https://doi.org/10.1038/ng.277>
- Brown, R.D., Jones, G.M., Laird, R.E., Hudson, P., Long, C.S. (2007). Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362(1), 200–05. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.003>

- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865), 813–20. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6), 1615–25.
- Bubenik, G.A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2336–48.
- Bułdak, Ł., Machnik, G., Bułdak, R.J., Łabuzek, K., Boldys, A., Okopień, B. (2016). Exenatide and metformin express their anti-inflammatory effects on human monocytes/macrophages by the attenuation of MAPKs and NFκB signaling. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 389(10), 1103–15. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1277-8>
- Bullard, K.M., Cowie, C.C., Lessem, S.E., Saydah, S.H., Menke, A., Geiss, L.S., Orchard, T.J., Rolka, D.B., Imperatore, G. (2018). Prevalence of Diagnosed Diabetes in Adults by Diabetes Type — United States, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 67(12), 359–61. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6712a2>
- Busik, J. V, Mohr, S., Grant, M.B. (2008). Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57(7), 1952–65. <https://doi.org/10.2337/db07-1520>
- Cacho, J., Sevillano, J., de Castro, J., Herrera, E., Ramos, M.P. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol. Metab.* 295(5), E1269–76. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90207.2008>
- Calixto, M.C., Lintomen, L., André, D.M., Leiria, L.O., Ferreira, D., Lellis-Santos, C., Anhô, G.F., Bordin, S., Landgraf, R.G., Antunes, E. (2013). Metformin attenuates the exacerbation of the allergic eosinophilic inflammation in high fat-diet-induced obesity in mice. *PLoS One* 8(10), e76786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076786>
- Cardinali, D.P., Scacchi Bernasconi, P. A., Reynoso, R., Reyes Toso, C.F., Scacchi, P. (2013). Melatonin may curtail the metabolic syndrome: Studies on initial and fully

- established fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 14(2), 2502–14. <https://doi.org/10.3390/ijms14022502>
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., García-Mauriño, S., Reiter, R.J., Guerrero, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18(3), 537–9. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0694fje>
- Carrillo-Vico, A., García-Pergañeda A., Naji, L., Calvo, J.R., Romero, M.P., Guerrero, J.M. (2003). Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(10), 2272–8. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3207-4>
- Ceriello, A., Esposito, K., Piconi, L., Ihnat, M. A., Thorpe, J.E., Testa, R., Boemi, M., Giugliano, D. (2008). Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57(5), 1349–54. <https://doi.org/10.2337/db08-0063>
- Chandran, R., George, B.P., Abrahamse, H., Parimelazhagan, T. (2017). Therapeutic effects of *Syzygium mundagam* bark methanol extract on type-2 diabetic complications in rats. *Biomed. Pharmacother.* 95, 167–74. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.08.061>
- Chang, Y.C., Wu, W.C. (2013). Dyslipidemia and diabetic retinopathy. *Rev. Diabet. Stud.* 10(2-3), 121–32. <https://doi.org/10.1900/RDS.2013.10.121>
- Chaurasia, S.S., Lim, R.R., Parikh, B.H., Wey, Y.S., Tun, B.B., Wong, T.Y., Luu, C.D., Agrawal, R., Ghosh, A., Mortellaro, A., Rackoczy, E., Mohan, R.R., Barathi, V.A. (2018). The NLRP3 Inflammasome May Contribute to Pathologic Neovascularization in the Advanced Stages of Diabetic Retinopathy. *Sci. Rep.* 8(1), 2847. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21198-z>
- Chen, Y., Wang, W., Liu, F., Tang, L., Tang, R., Li, W. (2015). Apoptotic effect of matrix metalloproteinases 9 in the development of diabetic retinopathy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8(9), 10452–9.

- Cheung, N., Wong, I.Y., Wong, T.Y. (2014). Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: Overview of clinical efficacy and evolving applications. *Diabetes Care* 37(4), 900–05. <https://doi.org/10.2337/dc13-1990>
- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlogge, A.W., Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–81. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
- Choi, Y.H., Kim, S.G., Lee, M.G. (2006). Dose-Independent Pharmacokinetics of Metformin in Rats: Hepatic and Gastrointestinal First-Pass Effects. *J. Pharm. Sci.* 95(11), 2543–52. <https://doi.org/10.1002/jps.20744>
- Chuffa, L.G.A., Reiter, R.J., Lupi, L.A. (2017). Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 38(10), 945–52. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx054>
- Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., Maestroni, J.M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* 28(4), 193–202.
- Crooke, A., Huete-Toral, F., Colligris, B., Pintor, J. (2017). The role and therapeutic potential of melatonin in age-related ocular diseases. *J. Pineal Res.* 63(2), e12430. <https://doi.org/10.1111/jpi.12430>
- Das, U.N. (2017). Is there a role for bioactive lipids in the pathobiology of diabetes mellitus? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 182. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00182>
- Deacon, C.F., Nauck, M.A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., Holst, J.J. (1995). Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44(9), 1126–31.
- DeFronzo, R.A., Tobin, J.D., Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol. Metab.* 237(3), E214-23. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214>

- Dehdashtian, E., Mehrzadi, S., Yousefi, B., Hosseinzadeh, A., Reiter, R.J., Safa, M., Ghaznavi, H., Naseripour, M. (2018). Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* 193, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.001>
- Deliyanti, D., Alrashdi, S.F., Tan, S.M., Meyer, C., Ward, K.W., de Haan, J.B., Wilkinson-Berka, J.L. (2018). Nrf2 Activation Is a Potential Therapeutic Approach to Attenuate Diabetic Retinopathy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 59(2), 815. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22920>
- Devi, T.S., Hosoya, K.I., Terasaki, T., Singh, L.P. (2013). Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: Implications for diabetic retinopathy. *Exp. Cell Res.* 319(7), 1001–12. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.01.012>
- Di, Y., Nie, Q.Z., Chen, X.L. (2016). Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression change in experimental retinal neovascularization. *Int. J. Ophthalmol.* 9(6), 804–8. <https://doi.org/10.18240/ijo.2016.06.02>
- Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group, Lachin, J.M., White, N.H., Hainsworth, D.P., Sun, W., Cleary, P.A., Nathan, D.M. (2015). Effect of Intensive Diabetes Therapy on the Progression of Diabetic Retinopathy in Patients With Type 1 Diabetes: 18 Years of Follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes* 64(2), 631–42. <https://doi.org/10.2337/db14-0930>
- do Carmo Buonfiglio, D., Peliciari-Garcia, R.A., do Amaral, F.G., Peres, R., Nogueira, T.C.A., Afeche, S.C., Cipolla-Neto, J. (2011). Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(10), 7416–22. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6756>
- Doganay, S., Evereklioglu, C., Er, H., Türköz, Y., Sevinç, A., Mehmet, N., Savli, H., (2002). Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)*. 16(2), 163–70. <https://doi.org/10.1038/sj/EYE/6700095>

- Dong, Y., Fan, C., Hu, W., Jiang, S., Ma, Z., Yan, X., Deng, C., Di, S., Xin, Z., Wu, G., Yang, Y., Reiter, R.J., Liang, G. (2016). Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling. *J. Pineal Res.* 60(3), 253–62. <https://doi.org/10.1111/jpi.12300>
- Du, M., Wu, M., Fu, D., Yang, S., Chen, J., Wilson, K., Lyons, T.J. (2013). Effects of modified LDL and HDL on retinal pigment epithelial cells: a role in diabetic retinopathy? *Diabetologia* 56(10), 2318–28. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2986-x>
- Du, Y., Miller, C.M., Kern, T.S. (2003). Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic. Biol. Med.* 35(11), 1491–9.
- Du, Y., Sarthy, V.P., Kern, T.S. (2004). Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 287(4), R735–41.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00080.2003>
- Dubocovich, M.L., Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine* 27(2), 101–10.
<https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:101>
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11(13), 1050–62.
<https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2009.08.013>
- Dwyer, M.A., Kazmin, D., Hu, P., McDonnell, D.P., Malek, G. (2011). Research resource: nuclear receptor atlas of human retinal pigment epithelial cells: potential relevance to age-related macular degeneration. *Mol. Endocrinol.* 25(2), 360–72.
<https://doi.org/10.1210/me.2010-0392>
- Ebrahim, Q., Chaurasia, S.S., Vasanji, A., Qi, J.H., Klenotic, P.A., Cutler, A., Asosingh, K., Erzurum, S., Anand-Apte, B. (2010). Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization in vivo. *Am. J. Pathol.* 176(1), 496–503.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.080642>

- Ehrmann, D.A., Cavaghan, M.K., Imperial, J., Sturis, J., Rosenfield, R.L., Polonsky, K.S. (1997). Effects of Metformin on Insulin Secretion, Insulin Action, and Ovarian Steroidogenesis in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(2), 524–30. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.2.3722>
- El Rami, H., Barham, R., Sun, J.K., Silva, P.S. (2017). Evidence-Based Treatment of Diabetic Retinopathy. *Semin. Ophthalmol.* 32(1), 67–74. <https://doi.org/10.1080/08820538.2016.1228397>
- Ellis, E.A., Guberski, D.L., Somogyi-Mann, M., Grant, M.B. (2000). Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic. Biol. Med.* 28(1), 91–101.
- Eyeops (2019). Diabetic retinopathy. Available at: <https://www.eyeops.com/eye-diseases/diabetic-retinopathy>. (Accessed :20 January 2019).
- Fasshauer, M., Paschke, R. (2003). Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46(12), 1594–1603. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1228-z>
- Favero, G., Franceschetti, L., Bonomini, F., Rodella, L.F., Rezzani, R. (2017). Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. *Int. J. Endocrinol.* 2017, 1835195. <https://doi.org/10.1155/2017/1835195>
- Feenstra, D.J., Yego, E.C., Mohr, S. (2013). Modes of Retinal Cell Death in Diabetic Retinopathy. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 4(5), 298. <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000298>
- Feng, S., Yu, H., Yu, Y., Geng, Y., Li, D., Yang, C., Lv, Q., Lu, L., Liu, T., Li, G., Yuan, L. (2018). Levels of Inflammatory Cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, and TNF- α in Aqueous Humour of Patients with Diabetic Retinopathy. *J. Diabetes Res.* 2018, 8546423. <https://doi.org/10.1155/2018/8546423>
- Fernandes, P.A., Cecon, E., Markus, R.P., Ferreira, Z.S. (2006). Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a “feedback” of the immune response on circadian timing. *J. Pineal Res.* 41(4), 344–50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00373.x>

- Fernández-Gil, B., Moneim, A.E.A., Ortiz, F., Shen, Y.Q., Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Guerra-Librero, A., Acuña-Castroviejo, D., Molina-Navarro, M.M., García-Verdugo, J.M., Sayed, R.K.A., Florido, J., Luna, J.D., López, L.C., Escames, G. (2017). Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity. *PLoS One* 12(4), e0174474.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174474>
- Fischer, T.W., Kleszczyński, K., Hardkop, L.H., Kruse, N., Zillikens, D. (2013). Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J. Pineal Res.* 54(3), 303–12. <https://doi.org/10.1111/jpi.12018>
- Fliesler, S.J., Bretillon, L. (2010). The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J. Lipid Res.* 51(12), 3399–413. <https://doi.org/10.1194/jlr.R010538>
- Frank, R.N. (2004). Diabetic Retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 350(1), 48–58.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra021678>
- Frese, T., Bach, A.G., Mühlbauer, E., Pönicke, K., Brömme, H.J., Welp, A., Peschke, E. (2009). Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci.* 85(13-14), 526–33. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.08.004>
- Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.P., O'Neill, H.M., Ford, R.J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D.G., Macaulay, S.L., Schertzer, J.D., Dyck, J.R.B., van Denderen, B.J., Kemp, B.E., Steinberg, G.R. (2013). Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat. Med.* 19(12), 1649–54. <https://doi.org/10.1038/nm.3372>
- Gagliardino, J.J., Hernandez, R.E. (1971). Circadian Variation of the Serum Glucose and Immunoreactive Insulin Levels. *Endocrinology* 88(6), 1529–31.
<https://doi.org/10.1210/endo-88-6-1529>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X.,

- Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19(1), 107–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- García, J.A., Volt, H., Venegas, C., Doerrier, C., Escames, G., López, L.C., Acuña-Castroviejo, D. (2015). Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice. *FASEB J.* 29(9), 3863–75. <https://doi.org/10.1096/fj.15-273656>
- Gardiner, T.A., Archer, D.B., Curtis, T.M., Stitt, A.W. (2007). Arteriolar Involvement in the Microvascular Lesions of Diabetic Retinopathy: Implications for Pathogenesis. *Microcirculation* 14(1), 25–38. <https://doi.org/10.1080/10739680601072123>
- Gardner, T.W., Davila, J.R. (2017). The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 255(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00417-016-3548-y>
- Gastinger, M.J., Singh, R.S.J., Barber, A.J. (2006). Loss of Cholinergic and Dopaminergic Amacrine Cells in Streptozotocin-Diabetic Rat and Ins2 Akita - Diabetic Mouse Retinas. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 47(7), 3143. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1376>
- Geraldes, P., Hiraoka-Yamamoto, J., Matsumoto, M., Clermont, A., Leitges, M., Marette, A., Aiello, L.P., Kern, T.S., King, G.L. (2009). Activation of PKC- δ and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 15(11), 1298–1306. <https://doi.org/10.1038/nm.2052>
- Geraldes, P., King, G.L. (2011). Activation of Protein Kinase C Isoforms and Its Impact on Diabetic Complications. *Circ Res* 106(8), 1319–31. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.Activation>
- Gesmundo, I., Villanova, T., Banfi, D., Gamba, G., Granata, R. (2017). Role of Melatonin, Galanin, and RFamide Neuropeptides QRFP26 and QRFP43 in the Neuroendocrine Control of Pancreatic β -Cell Function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 143. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00143>

- Ghasemi, A., Khalifi, S., Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol. Hung.* 101(4), 408–20. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2>
- Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19(3), 257–67.
- Gong, X., Rubin, L.P. (2015). Role of macular xanthophylls in prevention of common neovascular retinopathies: Retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 572, 40–8. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.02.004>
- Gorray, K., Quay, W., Ewart, R.B. (1979). Effects of Pinealectomy and Pineal Incubation Medium and Sonicates on Insulin Release by Isolated Pancreatic Islets In Vitro. *Horm. Metab. Res.* 11(7), 432–6. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1092754>
- Green, C.B., Takahashi, J.S., Bass, J. (2008). The Meter of Metabolism. *Cell* 134(5), 728–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.022>
- Gupta, N., Mansoor, S., Sharma, A., Sapkal, A., Sheth, J., Falatoonzadeh, P., Kuppermann, B., Kenney, M. (2013). Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol. J.* 7, 4–10. <https://doi.org/10.2174/1874364101307010004>
- Ha, E., Yim, S.V., Chung, J.H., Yoon, K.S., Kang, I., Cho, Y.H., Baik, H.H. (2006). Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J. Pineal Res.* 41(1), 67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00334.x>
- Hammer, S.S., Beli, E., Kady, N., Wang, Q., Wood, K., Lydic, T.A., Malek, G., Saban, D.R., Wang, X.X., Hazra, S., Levi, M., Busik, J. V., Grant, M.B. (2017). The Mechanism of Diabetic Retinopathy Pathogenesis Unifying Key Lipid Regulators, Sirtuin 1 and Liver X Receptor. *EBioMedicine* 22, 181–90. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.008>
- Han, J., Li, Y., Liu, X., Zhou, T., Sun, H., Edwards, P., Gao, H., Yu, F.S., Qiao, X., 2018. Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One* 13(3), e0193031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193031>

- Hardeland, R., Madrid, J.A., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J. Pineal Res.* 52(2), 139–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00934.x>
- Haskins, K., Bradley, B., Powers, K., Fadok, V., Flores, S., Ling, X., Pugazhenti, S., Reusch, J., Kench, J. (2003). Oxidative stress in type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1005, 43–54.
- Hildebrand, G.D., Fielder, A.R. (2011). Anatomy and physiology of the retina, in: Reynolds, J.D., Olitsky, S.E. (Eds.), *Pediatric Retina*. Springer, New York, pp. 39–65. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12041-1>
- Hotamisligil, G.S. (1999). Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107(2), 119–25. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1212086>
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Hristova, M., Tzaneva, M., Bekyarova, G., Chivchibashi, D., Stefanova, N., Kiselova-Kaneva, Y. (2018). Molecular Mechanisms of Melatonin Protection from Gastric Mucosal Apoptotic Injury in Experimental Burns. *Molecules* 23(4), pii: E749. <https://doi.org/10.3390/molecules23040749>
- Huang, H., Gandhi, J.K., Zhong, X., Wei, Y., Gong, J., Duh, E.J., Vinore, S.A. (2011). TNF α is required for late BRB breakdown in diabetic retinopathy, and its inhibition prevents leukostasis and protects vessels and neurons from apoptosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(3), 1336–44. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5768>
- Iuvone, P.M., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D.C., Chaurasia, S.S. (2005). Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24(4), 433–56. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2005.01.003>

- Jang, S.Y., Kim, A., Kim, J.K., Kim, C., Cho, Y.H., Kim, J.H., Kim, C.H., Lee, J.Y. (2014). Metformin inhibits tumor cell migration via down-regulation of MMP9 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Anticancer Res.* 34(8), 4127–34.
- Jayashree, K., Yasir, M., Senthilkumar, G.P., Ramesh Babu, K., Mehalingam, V., Mohanraj, P.S. (2018). Circulating matrix modulators (MMP-9 and TIMP-1) and their association with severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 12(6), 869–73. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.05.006>
- Jiang, T., Chang, Q., Cai, J., Fan, J., Zhang, X., Xu, G. (2016). Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/3528274>
- Jiang, T., Chang, Q., Zhao, Z., Yan, S., Wang, L., Cai, J., Xu, G. (2012). Melatonin-Mediated Cytoprotection against Hyperglycemic Injury in Müller Cells. *PLoS One* 7(12), e50661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050661>
- Jin, C., Flavell, R.A. (2010). Molecular Mechanism of NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Clin. Immunol.* 30(5), 628–31. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9440-3>
- Joussen, A.M., Doehmen, S., Le, M.L., Koizumi, K., Radetzky, S., Krohne, T.U., Poulaki, V., Semkova, I., Kociok, N. (2009). TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol. Vis.* 15, 1418–28.
- Joussen, A.M., Poulaki, V., Le, M.L., Koizumi, K., Esser, C., Janicki, H., Schraermeyer, U., Kociok, N., Fauser, S., Kirchhof, B., Kern, T.S., Adamis, A.P. (2004). A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J.* 18(12), 1450–52. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1476fje>
- Kalousová, M., Skrha, J., Zima, T. (2002). Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* 51(6), 597–604.

- Katz, A., Nambi, S.S., Mather, K., Baron, A.D., Follmann, D.A., Sullivan, G., Quon, M.J. (2000). Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(7), 2402–10. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6661>
- Kaul, K., Hodgkinson, A., Tarr, J.M., Kohner, E.M., Chibber, R. (2010). Is inflammation a common retinal-renal-nerve pathogenic link in diabetes? *Curr. Diabetes Rev.* 6(5), 294–303.
- Kaur, C., Foulds, W.S., Ling, E.A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: Basic concepts, clinical features and management. *Prog. Retin. Eye Res.* 27(6), 622–47. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.09.003>
- Kim, S.D., Yang, S.I., Kim, H.C., Shin, C.Y., Ko, K.H. (2007). Inhibition of GSK-3 β mediates expression of MMP-9 through ERK1/2 activation and translocation of NF- κ B in rat primary astrocyte. *Brain Res.* 1186, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.018>
- Klaassen, I., Van Noorden, C.J.F., Schlingemann, R.O. (2013). Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog. Retin. Eye Res.* 34, 19–48. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.02.001>
- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L. (1984). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 102(4), 520–6.
- Klein, B.E., Moss, S.E., Klein, R., Surawicz, T.S. (1991). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology* 98(8), 1261–5.
- Kocic, G., Tomovic, K., Kocic, H., Sokolovic, D., Djordjevic, B., Stojanovic, S., Arsic, I., Smelcerovic, A. (2017). Antioxidative, membrane protective and antiapoptotic effects of melatonin, in silico study of physico-chemical profile and efficiency of nanoliposome delivery compared to betaine. *RSC Adv.* 7(3), 1271–81. <https://doi.org/10.1039/C6RA24741E>

- Kowluru, R.A. (2001). Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetol.* 38(4), 179–85.
- Kowluru, R.A. (2003). Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrative stress in diabetic rats. *Diabetes* 52(3), 818–23.
- Kowluru, R.A. (2010). Role of matrix metalloproteinase-9 in the development of diabetic retinopathy and its regulation by H-Ras. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51(8), 4320–6. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4851>
- Kowluru, R.A. (2017). Diabetic retinopathy, metabolic memory and epigenetic modifications. *Vision Res.* 139, 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.02.011>
- Kowluru, R.A., Abbas, S.N. (2003). Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(12), 5327–34.
- Kowluru, R., Chan, P.S. (2007). Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* 2007, 43603. <https://doi.org/10.1155/2007/43603>
- Kowluru, R.A., Santos, J.M., Zhong, Q. (2014). Sirt1, a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 in diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55(9), 5653–60. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14383>
- Kowluru, R.A., Shan, Y. (2017). Role of oxidative stress in epigenetic modification of MMP-9 promoter in the development of diabetic retinopathy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 255,(5) 955–62. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3594-0>
- Kowluru, R.A., Tang, J., Kern, T.S. (2001). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 50(8), 1938–42.
- Kowluru, R.A., Zhong, Q., Santos, J.M. (2012). Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21(6), 797–805. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.681043>
- Krause, D.N., Dubocovich, M.L. (1990). Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends Neurosci.* 13(11), 464–70. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90100-O](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90100-O)

- Krishnasamy, G., Muthusamy, K., Chellappan, D.R., Subbiah, N. (2016). Antidiabetic, antihyperlipidaemic, and antioxidant activity of *Syzygium densiflorum* fruits in streptozotocin and nicotinamide-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* 54(9), 1716–26. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1125932>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* 87(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kumari, S., Panda, S., Mangaraj, M., Mandal, M.K., Mahapatra, P.C. (2008). Plasma MDA and antioxidant vitamins in diabetic retinopathy. *Indian J. Clin. Biochem.* 23(2), 158–162. <https://doi.org/10.1007/s12291-008-0035-1>
- Leasher, J.L., Bourne, R.R.A., Flaxman, S.R., Jonas, J.B., Keeffe, J., Naidoo, K., Pesudovs, K., Price, H., White, R.A., Wong, T.Y., Resnikoff, S., Taylor, H.R., Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study (2016). Global Estimates on the Number of People Blind or Visually Impaired by Diabetic Retinopathy: A Meta-analysis From 1990 to 2010. *Diabetes Care* 39(9), 1643–9. <https://doi.org/10.2337/dc15-2171>
- Lee, I.T., Lin, C.C., Wu, Y.C., Yang, C.M. (2010). TNF- α induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: Role of TNFR1/TRAF2/PKC α -dependent signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 224(2), 454–64. <https://doi.org/10.1002/jcp.22142>
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W. (1958). Isolation of Melatonin, The Pineal Gland Factor That Lightens Melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80(10), 2587–2587. <https://doi.org/10.1021/ja01543a060>
- Li, L., Li, Y., Zhou, Y., Ge, Z., Wang, L., Li, Z., Guo, Y., Jin, L., Ren, Y., Liu, J., Xu, Y. (2017). Jiangtang Xiaozhi Recipe (降糖消脂方) prevents diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chin. J. Integr. Med.* 23(6), 425–32. <https://doi.org/10.1007/s11655-016-2595-x>
- Li, W.D., Li, N.P., Song, D.D., Rong, J.J., Qian, A.M., Li, X.Q. (2017). Metformin inhibits endothelial progenitor cell migration by decreasing matrix

- metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9, via the AMPK/mTOR/autophagy pathway. *Int. J. Mol. Med.* 39(5), 1262–8. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2929>
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., Guarente, L. (2007). SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR. *Mol. Cell* 28(1), 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.032>
- Li, X., Zhang, M., Tang, W. (2013). Effects of melatonin on streptozotocin-induced retina neuronal apoptosis in high blood glucose rat. *Neurochem. Res.* 38(3), 669–76. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0966-z>
- Li, Y., Wu, H., Liu, N., Cao, X., Yang, Z., Lu, B., Hu, R., Wang, X., Wen, J. (2017). Melatonin exerts an inhibitory effect on insulin gene transcription via MTNR1B and the downstream Raf-1/ERK signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* 41(2), 955–61. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3305>
- Lim, J.H., Lee, Y.M., Chun, Y.S., Chen, J., Kim, J.E., Park, J.W. (2010). Sirtuin 1 Modulates Cellular Responses to Hypoxia by Deacetylating Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Mol. Cell* 38(6), 864–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.023>
- Lin, C., Titchenell, P.M., Keil, J.M., Garcia-Ocaña, A., Bolinger, M.T., Abcouwer, S.F., Antonetti, D.A. (2018). Inhibition of Atypical Protein Kinase C Reduces Inflammation-Induced Retinal Vascular Permeability. *Am. J. Pathol.* 188(10), 2392–2405. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.06.020>
- Liu, X., Ye, F., Xiong, H., Hu, D., Limb, G.A., Xie, T., Peng, L., Yang, W., Sun, Y., Zhou, M., Song, E., Zhang, D.Y. (2014). IL-1 β Upregulates IL-8 Production in Human Müller Cells Through Activation of the p38 MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways. *Inflammation* 37(5), 1486–95. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9874-5>
- Lo, C.C., Lin, S.H., Chang, J.S., Chien, Y.W. (2017). Effects of melatonin on glucose homeostasis, antioxidant ability, and adipokine secretion in ICR mice with NA/STZ-induced hyperglycemia. *Nutrients* 9(11), pii: E1187. <https://doi.org/10.3390/nu9111187>

- Lott, M.E.J., Slocomb, J.E., Shivkumar, V., Smith, B., Gabbay, R.A., Quillen, D., Gardner, T.W., Bettermann, K. (2012). Comparison of retinal vasodilator and constrictor responses in type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol.* 90(6), e434–41. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.02445.x>
- Loukovaara, S., Piippo, N., Kinnunen, K., Hytti, M., Kaarniranta, K., Kauppinen, A. (2017). NLRP3 inflammasome activation is associated with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 95(8), 803–08. <https://doi.org/10.1111/aos.13427>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–75.
- Lu, M., Kuroki, M., Amano, S., Tolentino, M., Keough, K., Kim, I., Bucala, R., Adamis, A.P. (1998). Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J. Clin. Invest.* 101(6), 1219–24. <https://doi.org/10.1172/JCI1277>
- Lu, M., Perez, V.L., Ma, N., Miyamoto, K., Peng, H.B., Liao, J.K., Adamis, A.P. (1999). VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40(8), 1808–12.
- Lutty, G.A., McLeod, D.S., Merges, C., Diggs, A., Plouët, J. (1996). Localization of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Retina and Choroid. *Arch. Ophthalmol.* 114(8), 971–7. <https://doi.org/10.1001/archopht.1996.01100140179011>
- Ma, X., Idle, J.R., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J. (2005). Metabolism Of Melatonin By Human Cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.* 33(4), 489–94. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002410>
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Lee, H.Y., Cline, G.W., Samuel, V.T., Kibbey, R.G., Shulman, G.I. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510(7506), 542–6. <https://doi.org/10.1038/nature13270>

- Madiraju, A.K., Qiu, Y., Perry, R.J., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Zhang, D., Camporez, J.-P.G., Cline, G.W., Butrico, G.M., Kemp, B.E., Casals, G., Steinberg, G.R., Vatner, D.F., Petersen, K.F., Shulman, G.I. (2018). Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. *Nat. Med.* 24(9), 1384–94. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0125-4>
- Madsen-Bouterse, S.A., Kowluru, R.A. (2008). Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 9(4), 315–27. <https://doi.org/10.1007/s11154-008-9090-4>
- Malínská, H., Oliyarnyk, O., Škop, V., Šilhavý, J., Landa, V., Zidek, V., Mlejnek, P., Šimáková, M., Strnad, H., Kazdová, L., Pravenec, M. (2016). Effects of Metformin on Tissue Oxidative and Dicarbonyl Stress in Transgenic Spontaneously Hypertensive Rats Expressing Human C-Reactive Protein. *PLoS One* 11(3), e0150924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150924>
- Mäntele, S., Otway, D.T., Middleton, B., Bretschneider, S., Wright, J., Robertson, M.D., Skene, D.J., Johnston, J.D. (2012). Daily Rhythms of Plasma Melatonin, but Not Plasma Leptin or Leptin mRNA, Vary between Lean, Obese and Type 2 Diabetic Men. *PLoS One* 7(5), e37123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037123>
- Marazita, M.C., Dugour, A., Marquioni-Ramella, M.D., Figueroa, J.M., Suburo, A.M. (2016). Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol.* 7, 78–87. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2015.11.011>
- Masana, M.I., Dubocovich, M.L. (2014). Melatonin Receptor Signaling : Finding the Path. *Sci. STKE* 2001(107), pe39. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.107.pe39>
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47(2), 224–9.
- Matthews, D.R., Stratton, I.M., Aldington, S.J., Holman, R.R., Kohner, E.M., UK Prospective Diabetes Study Group (2004). Risks of Progression of Retinopathy

- and Vision Loss Related to Tight Blood Pressure Control in Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch. Ophthalmol.* 122(11), 1631.
<https://doi.org/10.1001/archophth.122.11.1631>
- Mauriz, J.L., Collado, P.S., Veneroso, C., Reiter, R.J., González-Gallego, J. (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J. Pineal Res.* 54(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x>
- Mayo, J.C., Sainz, R.M., González Menéndez, P., Cepas, V., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2017). Melatonin and sirtuins: A “not-so unexpected” relationship. *J. Pineal Res.* 62(2), e12391. <https://doi.org/10.1111/jpi.12391>
- McLeod, D.S., Lefer, D.J., Merges, C., Luttly, G.A. (1995). Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am. J. Pathol.* 147(3), 642–53.
- McMullan, C.J., Schernhammer, E.S., Rimm, E.B., Hu, F.B., Forman, J.P. (2013). Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA* 309(13), 1388–96.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.2710>
- Mehrzadi, S., Motevalian, M., Rezaei Kanavi, M., Fatemi, I., Ghaznavi, H., Shahriari, M. (2018). Protective effect of melatonin in the diabetic rat retina. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 32(4), 414–21. <https://doi.org/10.1111/fcp.12361>
- Metea, M.R., Newman, E.A. (2007). Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Exp. Physiol.* 92(4), 635–40.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.036376>
- Mishra, M., Flaga, J., Kowluru, R.A. (2016). Molecular Mechanism of Transcriptional Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 in Diabetic Retinopathy. *J. Cell. Physiol.* 231(8), 1709–18. <https://doi.org/10.1002/jcp.25268>
- Mishra, M., Kowluru, R.A. (2017). Role of PARP-1 as a novel transcriptional regulator of MMP-9 in diabetic retinopathy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863(7), 1761–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.04.024>

- Mishra, M., Kowluru, R.A. (2016). The Role of DNA Methylation in the Metabolic Memory Phenomenon Associated With the Continued Progression of Diabetic Retinopathy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 57(13), 5748–57.
<https://doi.org/10.1167/iovs.16-19759>
- Mishra, A., Newman, E.A. (2010). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reverses the loss of functional hyperemia in diabetic retinopathy. *Glia* 58(16), 1996–2004.
<https://doi.org/10.1002/glia.21068>
- Miyamoto, K., Khosrof, S., Bursell, S.E., Rohan, R., Murata, T., Clermont, A.C., Aiello, L.P., Ogura, Y., Adamis, A.P. (1999). Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(19), 10836–41.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10836>
- Mizutani, M., Kern, T.S., Lorenzi, M. (1996). Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J. Clin. Invest.* 97(12), 2883–90. <https://doi.org/10.1172/JCI118746>
- Mohammad, G., Kowluru, R.A. (2012). Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9. *J. Cell. Physiol.* 227(3), 1052–61.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22822>
- Mohr, S., Xi, X., Tang, J., Kern, T.S. (2002). Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients. *Diabetes* 51(4), 1172–9.
- Montilla, P.L., Vargas, J.F., Túnez, I.F., Muñoz de Agueda, M.C., Valdelvira, M.E., Cabrera, E.S. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 25(2), 94–100.
- Morgan, M.J., Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 21(1), 103–15. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Morgan, P.J., Mercer, J.G. (2001). The regulation of body weight: lessons from the seasonal animal. *Proc. Nutr. Soc.* 60(1), 127–34.

- Mostafa, D.K., Ismail, C.A., Ghareeb, D.A. (2016). Differential metformin dose-dependent effects on cognition in rats: role of Akt. *Psychopharmacology (Berl)*. 233(13), 2513–24. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4301-2>
- Mugisho, O.O., Rupenthal, I.D., Squirrell, D.M., Bould, S.J., Danesh-Meyer, H. V., Zhang, J., Green, C.R., Acosta, M.L. (2018). Intravitreal pro-inflammatory cytokines in non-obese diabetic mice: Modelling signs of diabetic retinopathy. *PLoS One* 13(8), e0202156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202156>
- Mühlbauer, E., Albrecht, E., Hofmann, K., Bazwinsky-Wutschke, I., Peschke, E. (2011). Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J. Pineal Res.* 51(3), 361–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00898.x>
- Mulder, H. (2017). Melatonin signalling and type 2 diabetes risk: too little, too much or just right? *Diabetologia* 60(5), 826–9. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4249-8>
- Mulherin, A.J., Oh, A.H., Kim, H., Grieco, A., Lauffer, L.M., Brubaker, P.L. (2011). Mechanisms Underlying Metformin-Induced Secretion of Glucagon-Like Peptide-1 from the Intestinal L Cell. *Endocrinology* 152(12), 4610–9. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1485>
- Murakami, T., Felinski, E.A., Antonetti, D.A. (2009). Occludin Phosphorylation and Ubiquitination Regulate Tight Junction Trafficking and Vascular Endothelial Growth Factor-induced Permeability. *J. Biol. Chem.* 284(31), 21036–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016766>
- Murakami, T., Frey, T., Lin, C., Antonetti, D.A. (2012). Protein Kinase C Phosphorylates Occludin Regulating Tight Junction Trafficking in Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Permeability In Vivo. *Diabetes* 61(6), 1573–83. <https://doi.org/10.2337/db11-1367>
- Müssig, K., Staiger, H., Machicao, F., Häring, H.U., Fritsche, A. (2010). Genetic variants in *MTNR1B* affecting insulin secretion. *Ann. Med.* 42(6), 387–93. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.502125>

- Nagorny, C.L.F., Sathanoori, R., Voss, U., Mulder, H., Wierup, N. (2011). Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *J. Pineal Res.* 50(4), 412–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00859.x>
- Nalini., M., Raghavulu, B. V., Annapurna, A., Avinash, P., Chandi, V., Swathi, N., Wasim, (2017). Correlation of various serum biomarkers with the severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 11(suppl 1), S451–4. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.03.034>
- Nam, S., Han, Y., Lee, W., Kang, B., Choi, M.K., Han, Y.H., Song, I.S. (2018). Effect of Red Ginseng Extract on the Pharmacokinetics and Efficacy of Metformin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharmaceutics* 10(3), pii: E80. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030080>
- Nasiry, D., Khalatbary, A.R., Ahmadvand, H. (2017). Therapeutic potential of *Juglans regia* L. Leaf extract against diabetic retinopathy in rat. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 20(11), 1275–81. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9465>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (2019). CID=896. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/896>. (Accessed: 20 January 2019).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (2019). CID=936. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/936>. (Accessed: 20 January 2019).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (2019). CID=4091. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>. (Accessed: 20 January 2019).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (2019). CID=5300. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5300>. (Accessed: 20 January 2019).
- Nelson, K.K., Melendez, J.A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.* 37(6), 768–84. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.008>

- Newman, E.A. (2015). Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370(1672), pii: 20140195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0195>
- Ničković, V.P., Novaković, T., Lazarević, S., Šulović, L., Živković, Z., Živković, J., Mladenović, B., Stojanović, N.M., Petrović, V., Sokolović, D.T. (2018). Pre- vs. post-treatment with melatonin in CCl₄ -induced liver damage: Oxidative stress inferred from biochemical and pathohistological studies. *Life Sci.* 202, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.003>
- Noda, K., Nakao, S., Ishida, S., Ishibashi, T. (2012). Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *J. Ophthalmol.* 2012, 279037. <https://doi.org/10.1155/2012/279037>
- Nogueira, T.C., Lellis-Santos, C., Jesus, D.S., Taneda, M., Rodrigues, S.C., Amaral, F.G., Lopes, A.M.S., Cipolla-Neto, J., Bordin, S., Anhô, G.F. (2011). Absence of Melatonin Induces Night-Time Hepatic Insulin Resistance and Increased Gluconeogenesis Due to Stimulation of Nocturnal Unfolded Protein Response. *Endocrinology* 152(4), 1253–63. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1088>
- Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchère, J.L., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A. (2000). Identification of the Melatonin-binding Site iMT/i sub3/sub as the Quinone Reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275(40), 31311–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005141200>
- Novelli, M., Poci, A., Lajoix, A., Beffy, P., Bezzi, D., Marchetti, P., Gross, R., Masiello, P. (2004). Alteration of β -cell constitutive NO synthase activity is involved in the abnormal insulin response to arginine in a new rat model of type 2 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 219(1-2), 77–82. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2004.01.010>
- Okamoto, T., Akuta, T., Tamura, F., van Der Vliet, A., Akaike, T. (2004). Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol. Chem.* 385(11), 997–1006. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.130>

- Oliveira, A.C. de, Andreotti, S., Sertie, R.A.L., Campana, A.B., de Proença, A.R.G., Vasconcelos, R.P., Oliveira, K.A. de, Coelho-de-Souza, A.N., Donato-Junior, J., Lima, F.B. (2018). Combined treatment with melatonin and insulin improves glycemic control, white adipose tissue metabolism and reproductive axis of diabetic male rats. *Life Sci.* 199, 158–66. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.040>
- Owino, S., Contreras-Alcantara, S., Baba, K., Tosini, G. (2016). Melatonin Signaling Controls the Daily Rhythm in Blood Glucose Levels Independent of Peripheral Clocks. *PLoS One* 11(1), e0148214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148214>
- Özdemir, G., Ergün, Y., Bakariş, S., Kılınç, M., Durdu, H., Ganiyusufoğlu, E. (2014). Melatonin prevents retinal oxidative stress and vascular changes in diabetic rats. *Eye* 28(8), 1020–7. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.127>
- Ozkan, E., Yaman, H., Cakir, E., Aydın, I., Oztosun, M., Agilli, M., Kurt, Y., Akgul, E., Cayci, T., Ilhan, N., Ilhan, N. (2011). The measurement of plasma melatonin levels by high performance liquid chromatography. *J. Exp. Integr. Med.* 2(1), 85–88. <https://doi.org/10.5455/jeim.211211.br.010>
- Palsamy, P., Subramanian, S. (2010). Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic β -cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J. Cell. Physiol.* 224(2), 423–32. <https://doi.org/10.1002/jcp.22138>
- Palsamy, P., Subramanian, S. (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812(7), 719–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.008>
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J., Zisapel, N., Cardinali, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85(3), 335–53. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.001>
- Patel, N. (2009). Targeting leukostasis for the treatment of early diabetic retinopathy. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 9(3), 222–9.

- Pemp, B., Garhofer, G., Weigert, G., Karl, K., Resch, H., Wolzt, M., Schmetterer, L. (2009). Reduced Retinal Vessel Response to Flicker Stimulation but Not to Exogenous Nitric Oxide in Type 1 Diabetes. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 50(9), 4029–32. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3260>
- Penn, J.S., Madan, A., Caldwell, R.B., Bartoli, M., Caldwell, R.W., Hartnett, M.E. (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 27(4), 331–71. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.05.001>
- Perreau-Lenz, S., Pévet, P., Buijs, R.M., Kalsbeek, A. (2004). The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol. Int.* 21(1), 1–25.
- Peschke, E., Frese, T., Chankiewitz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., Spessert, R., Mühlbauer, E. (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J. Pineal Res.* 40(2), 135–43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00287.x>
- Peschke, E., Hofmann, K., Bähr, I., Streck, S., Albrecht, E., Wedekind, D., Mühlbauer, E. (2011). The insulin-melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus). *Diabetologia* 54(7), 1831–40. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2138-0>
- Pikuleva, I.A., Curcio, C.A. (2014). Cholesterol in the retina: The best is yet to come. *Prog. Retin. Eye Res.* 41, 64–89. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.03.002>
- Pontes, G.N., Cardoso, E.C., Carneiro-Sampaio, M.M.S., Markus, R.P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J. Pineal Res.* 43(4), 365–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00487.x>
- Radhakrishnan, C., Shahanasck, C., Sreejith, K., Bindu, S. (2018). Quality of Life in Type 2 Diabetic Patients With and Without Proliferative Retinopathy and Macular Edema. *Diabetes* 67(suppl 1), 2213–PUB. <https://doi.org/10.2337/db18-2213-PUB>
- Raygan, F., Ostadmohammadi, V., Bahmani, F., Reiter, R.J., Asemi, Z. (2017). Melatonin administration lowers biomarkers of oxidative stress and cardio-

- metabolic risk in type 2 diabetic patients with coronary heart disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Nutr.* 38(1), 191–6. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.12.004>
- Redfern, W.S., Storey, S., Tse, K., Hussain, Q., Maung, K.P., Valentin, J.P., Ahmed, G., Bigley, A., Heathcote, D., McKay, J.S. (2011). Evaluation of a convenient method of assessing rodent visual function in safety pharmacology studies: Effects of sodium iodate on visual acuity and retinal morphology in albino and pigmented rats and mice. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 63(1), 102–14. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.06.008>
- Reiter, R.J., Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Alatorre-Jimenez, M., Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 61(3) 253–78. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
- Reiter, R.J., Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Jou, M.J., Galano, A., Xu, B. (2017). Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution’s best ideas. *Cell. Mol. Life Sci.*, 74(21), 3863–81 <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7>
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Galano, A. (2014). Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology* 29(5), 325–33. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J., Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50(4), 1129–46. <https://doi.org/0350041129>
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E. (2000). Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress. *J. Biomed. Sci.* 7(6), 444–58. <https://doi.org/10.1159/000025480>
- Rena, G., Hardie, D.G., Pearson, E.R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60(9), 1577–85. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Rheinheimer, J., de Souza, B.M., Cardoso, N.S., Bauer, A.C., Crispim, D. (2017). Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A

- systematic review. *Metabolism* 74, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.06.002>
- Ríos-Lugo, M.J., Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, M.P., Scacchi, P.A., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I. (2010). Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J. Pineal Res.* 49(4), 342–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00798.x>
- Rosenberg, G.A. (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 8(2), 205–16.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70016-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70016-X)
- Rowland, N.E. (2007). Food or fluid restriction in common laboratory animals: Balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comp. Med.* 57(2), 149–60.
- Roy, S., Kern, T.S., Song, B., Stuebe, C. (2017). Mechanistic Insights into Pathological Changes in the Diabetic Retina. *Am. J. Pathol.* 187(1), 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.08.022>
- Rui, L., Aguirre, V., Kim, J.K., Shulman, G.I., Lee, A., Corbould, A., Dunaif, A., White, M.F. (2001). Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* 107(2), 181–9.
<https://doi.org/10.1172/JCI10934>
- Rungger-Brändle, E., Dosso, A.A., Leuenberger, P.M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(7), 1971–80.
- Salido, E.M., Bordone, M., De Laurentiis, A., Chianelli, M., Keller Sarmiento, M.I., Dorfman, D., Rosenstein, R.E. (2013). Therapeutic efficacy of melatonin in reducing retinal damage in an experimental model of early type 2 diabetes in rats. *J. Pineal Res.* 54(2), 179–89. <https://doi.org/10.1111/jpi.12008>
- Salido, E.M., de Zavalía, N., Schreier, L., De Laurentiis, A., Rettori, V., Chianelli, M., Keller Sarmiento, M.I., Arias, P., Rosenstein, R.E. (2012). Retinal changes in an experimental model of early type 2 diabetes in rats characterized by non-fasting

- hyperglycemia. *Exp. Neurol.* 236(1), 151–60.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.010>
- Saperstein, S., Chen, L., Oakes, D., Pryhuber, G., Finkelstein, J. (2009). IL-1 β Augments TNF- α -Mediated Inflammatory Responses from Lung Epithelial Cells. *J. Interf. Cytokine Res.* 29(5), 273–84. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0076>
- Sartori, C., Dessen, P., Mathieu, C., Monney, A., Bloch, J., Nicod, P., Scherrer, U., Duplain, H. (2009). Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology* 150(12), 5311–7. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0425>
- Scheer, F.A.J.L., Czeisler, C.A. (2005). Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Med. Rev.* 9(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2004.11.004>
- Schomerus, C., Laedtke, E., Olcese, J., Weller, J., Klein, D., Korf, H.W. (2002). Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res.* 309(3), 417–28. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0588-x>
- Schroder, K., Zhou, R., Tschopp, J. (2010). The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger? *Science* 327(5936), 296–300. <https://doi.org/10.1126/science.1184003>
- Service, F.J., O'Brien, P.C. (2001). The relation of glycaemia to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetic Control and Complications Trial. *Diabetologia* 44(10), 1215–20. <https://doi.org/10.1007/s001250100635>
- Shah, S.A., Khan, M., Jo, M.H., Jo, M.G., Amin, F.U., Kim, M.O. (2017). Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. *CNS Neurosci. Ther.* 23(1), 33–44. <https://doi.org/10.1111/cns.12588>
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>

- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Shibuya, M. (2006). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39(5), 469–78.
- Shin, J.A., Kim, H.S., Vargas, A., Yu, W.Q., Eom, Y.S., Craft, C.M., Lee, E.J. (2016). Inhibition of Matrix Metalloproteinase 9 Enhances Rod Survival in the S334ter-line3 Retinitis Pigmentosa Model. *PLoS One* 11(11), e0167102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167102>
- Simões, D., Riva, P., Peliciari-Garcia, R.A., Cruzat, V.F., Graciano, M.F., Munhoz, A.C., Taneda, M., Cipolla-Neto, J., Carpinelli, A.R. (2016). Melatonin modifies basal and stimulated insulin secretion via NADPH oxidase. *J. Endocrinol.* 231(3), 235–44. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0259>
- Simonneaux, V., Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55(2), 325–95. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2>
- Singh, B., Saxena, A. (2010). Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J. Diabetes* 1(2), 36-47. <https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i2.36>
- Slominski, A., Tobin, D.J., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Paus, R. (2008). Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 19(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.10.007>
- Slominski, R.M., Reiter, R.J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R.S., Slominski, A.T. (2012). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351(2), 152–66. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.004>
- Sokolovic, D., Djindjic, B., Nikolic, J., Bjelakovic, G., Pavlovic, D., Kocic, G., Krstic, D., Cvetkovic, T., Pavlovic, V. (2008). Melatonin reduces oxidative stress induced

- by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. *J. Radiat. Res.* 49(6), 579–86.
- Solomon, S.D., Chew, E., Duh, E.J., Sobrin, L., Sun, J.K., VanderBeek, B.L., Wykoff, C.C., Gardner, T.W. (2017). Diabetic retinopathy: A position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 40(3), 412–8.
<https://doi.org/10.2337/dc16-2641>
- Sone, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Kondo, S., Hanatani, M., Suzuki, H., Yamashita, K. (1996). Vascular Endothelial Growth Factor Is Induced by Long-Term High Glucose Concentration and Up-Regulated by Acute Glucose Deprivation in Cultured Bovine Retinal Pigmented Epithelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221(1), 193–8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0568>
- Sparsø, T., Bonnefond, A., Andersson, E., Bouatia-Naji, N., Holmkvist, J., Wegner, L., Grarup, N., Gjesing, A.P., Banasik, K., Cavalcanti-Proença, C., Marchand, M., Vaxillaire, M., Charpentier, G., Jarvelin, M.-R., Tichet, J., Balkau, B., Marre, M., Lévy-Marchal, C., Faerch, K., Borch-Johnsen, K., Jørgensen, T., Madsbad, S., Poulsen, P., Vaag, A., Dina, C., Hansen, T., Pedersen, O., Froguel, P. (2009). G allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans. *Diabetes* 58(6), 1450–6.
<https://doi.org/10.2337/db08-1660>
- Srinivasan, K., Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* 125(3), 451–72.
- Stem, M.S., Gardner, T.W. (2013). Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* 20(26), 3241–50. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990027>
- Stewart, M.W.(2010). Pathophysiology of Diabetic Retinopathy, in: Browning, D.J. (Ed.), *Diabetic Retinopathy: Evidence-Based Management*. Springer, New York, pp. 1–30.

- Stewart, M.W. (2016). Treatment of diabetic retinopathy: Recent advances and unresolved challenges. *World J. Diabetes* 7(16), 333-41. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i16.333>
- Stratton, I.M., Kohner, E.M., Aldington, S.J., Turner, R.C., Holman, R.R., Manley, S.E., Matthews, D.R. (2001). UKPDS 50: Risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 44(2), 156–63. <https://doi.org/10.1007/s001250051594>
- Sun, H., Wang, X., Chen, J., Gusdon, A.M., Song, K., Li, L., Qu, S. (2018). Melatonin Treatment Improves Insulin Resistance and Pigmentation in Obese Patients with Acanthosis Nigricans. *Int. J. Endocrinol.* 2018, 2304746. <https://doi.org/10.1155/2018/2304746>
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50(6), 537–46.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* 237(5), 481–90. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.011372>
- Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., Shibasaki, M. (2008). Hypoglycaemic effects of antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103(6), 560–8. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00321.x>
- Tam, C.H.T., Ho, J.S.K., Wang, Y., Lee, H.M., Lam, V.K.L., Germer, S., Martin, M., So, W.Y., Ma, R.C.W., Chan, J.C.N., Ng, M.C.Y. (2010). Common Polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK Are Associated with Increased Fasting Plasma Glucose and Impaired Beta-Cell Function in Chinese Subjects. *PLoS One* 5(7), e11428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011428>
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Galano, A., Reiter, R.J. (2014). Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Curr. Med. Chem.* 21(13), 1557–65.

- Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., Reiter, R.J. (2007). One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42(1), 28–42.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Allegra, M., Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* 2(2), 181–97.
- Tang, J., Kern, T.S. (2011). Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 30(5), 343–58. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.05.002>
- Tarr, J.M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E.M., Chibber, R. (2013). Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 2013, 343560.
<https://doi.org/10.1155/2013/343560>
- Thichanpiang, P., Wongprasert, K. (2015). Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates TNF- α -Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression and Monocyte Adhesion to Retinal Pigment Epithelial Cells. *Am. J. Chin. Med.* 43(1), 103–19. <https://doi.org/10.1142/S0192415X1550007X>
- Titchenell, P.M., Lin, C.M., Keil, J.M., Sundstrom, J.M., Smith, C.D., Antonetti, D.A. (2012). Novel atypical PKC inhibitors prevent vascular endothelial growth factor-induced blood–retinal barrier dysfunction. *Biochem. J.* 446(3), 455–67.
<https://doi.org/10.1042/BJ20111961>
- Tosini, G., Menaker, M. (1998). The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 789(2), 221–8.
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Van Obberghen, E. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276, 43836–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106534200>
- Tuomi, T., Nagorny, C.L.F., Singh, P., Bennet, H., Yu, Q., Alenkvist, I., Isomaa, B., Östman, B., Söderström, J., Pesonen, A.-K., Martikainen, S., Räikkönen, K., Forsén, T., Hakaste, L., Almgren, P., Storm, P., Asplund, O., Shcherbina, L., Fex,

- M., Fadista, J., Tengholm, A., Wierup, N., Groop, L., Mulder, H. (2016). Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 23(6), 1067–77. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.009>
- Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37(6), 375–536. <https://doi.org/10.1080/10409230290771546>
- van der Wijk, A.E., Vogels, I.M.C., van Noorden, C.J.F., Klaassen, I., Schlingemann, R.O. (2017). TNF α -Induced Disruption of the Blood–Retinal Barrier In Vitro Is Regulated by Intracellular 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate Levels. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58(9), 3496-505. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21091>
- van Hecke, M.V., Dekker, J.M., Nijpels, G., Moll, A.C., Heine, R.J., Bouter, L.M., Polak, B.C.P., Stehouwer, C.D.A. (2005). Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia* 48(7), 1300–6. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1799-y>
- Van Leiden, H.A., Dekker, J.M., Moll, A.C., Nijpels, G., Heine, R.J., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D.A., Polak, B.C.P. (2002). Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: The Hoorn Study. *Diabetes Care* 25(8), 1320–5. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.8.1320>
- Vincent, J.A., Mohr, S. (2007). Inhibition of Caspase-1/Interleukin-1beta Signaling Prevents Degeneration of Retinal Capillaries in Diabetes and Galactosemia. *Diabetes* 56(1), 224–30. <https://doi.org/10.2337/db06-0427>
- Waly, N.E., Hallworth, R. (2015). Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J. Circadian Rhythms* 13, 1. <https://doi.org/10.5334/jcr.ab>
- Wang, J., Chen, S., Jiang, F., You, C., Mao, C., Yu, J., Han, J., Zhang, Z., Yan, H. (2014). Vitreous and Plasma VEGF Levels as Predictive Factors in the Progression of Proliferative Diabetic Retinopathy after Vitrectomy. *PLoS One* 9(10), e110531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110531>

- Wang, J.J., Zhu, M., Le, Y.Z. (2015). Functions of Müller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World J. Diabetes* 6(5), 726–33. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i5.726>
- Wen Li, H.H., Li, W., He, J., Barnabie, P., Shealy, D., Vinore, S.A. (2014). Blockade of Tumor Necrosis Factor Alpha Prevents Complications of Diabetic Retinopathy. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 5(6), 1–12. <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000384>
- Wilson, C.H., Ali, E.S., Scrimgeour, N., Martin, A.M., Hua, J., Tallis, G.A., Rychkov, G.Y., Barritt, G.J. (2015). Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca²⁺ entry and reduces ER Ca²⁺ through a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem. J.* 466(2), 379–90. <https://doi.org/10.1042/BJ20140881>
- Winiarska, K., Fraczyk, T., Malinska, D., Drozak, J., Bryla, J. (2006). Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J. Pineal Res.* 40(2), 168–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00295.x>
- Wisniewska-Kruk, J., Klaassen, I., Vogels, I.M.C., Magno, A.L., Lai, C.M., Van Noorden, C.J.F., Schlingemann, R.O., Rakoczy, E.P. (2014). Molecular analysis of blood-retinal barrier loss in the Akimba mouse, a model of advanced diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* 122, 123–31. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.03.005>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49(5), 1304–13.
- Witkowska, A.M., Borawska, M.H. (2004). Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur. Cytokine Netw.* 15(2), 91–8.
- Wu, G. (2010). *Diabetic Retinopathy: The Essentials*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Wu, L., Parhofer, K.G. (2014). Diabetic dyslipidemia. *Metabolism* 63(12), 1469–79. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.010>
- Xia, Q., Chen, Z.X., Wang, Y.C., Ma, Y.S., Zhang, F., Che, W., Fu, D., Wang, X.F. (2012). Association between the Melatonin Receptor 1B Gene Polymorphism on

- the Risk of Type 2 Diabetes, Impaired Glucose Regulation: A Meta-Analysis. *PLoS One* 7(11), e50107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050107>
- Xie, M., Hu, A., Luo, Y., Sun, W., Hu, X., Tang, S. (2014). Interleukin-4 and melatonin ameliorate high glucose and interleukin-1 β stimulated inflammatory reaction in human retinal endothelial cells and retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* 20, 921–8.
- Xu, G., Liu, B., Sun, Y., Du, Y., Snetselaar, L.G., Hu, F.B., Bao, W. (2018). Prevalence of diagnosed type 1 and type 2 diabetes among US adults in 2016 and 2017: population based study. *BMJ* 362, k1497. <https://doi.org/10.1136/bmj.k1497>
- Xu, H.Z., Le, Y.Z. (2011). Significance of Outer Blood–Retina Barrier Breakdown in Diabetes and Ischemia. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 52(5), 2160. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6518>
- Xu, Y., Lu, X., Hu, Y., Yang, B., Tsui, C.-K., Yu, S., Lu, L., Liang, X. (2018). Melatonin attenuated retinal neovascularization and neuroglial dysfunction by inhibition of HIF-1 α -VEGF pathway in oxygen-induced retinopathy mice. *J. Pineal Res.* 64(4), e12473. <https://doi.org/10.1111/jpi.12473>
- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R.P., Hall, M.E., Lindsey, M.L. (2013). Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 28(6), 391–403. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2013>
- Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J., Evans, R.M. (2008). Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451, 964–9. <https://doi.org/10.1038/nature06668>
- Yao, Y., Li, R., Du, J., Li, X., Zhao, L., Long, L., Li, D., Lu, S. (2018). Tumor necrosis factor- α and diabetic retinopathy: Review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta* 485, 210–7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.06.028>
- Yau, J.W.Y., Rogers, S.L., Kawasaki, R., Lamoureux, E.L., Kowalski, J.W., Bek, T., Chen, S.-J., Dekker, J.M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R.F.,

- Ikram, M.K., Kayama, T., Klein, B.E.K., Klein, R., Krishnaiah, S., Mayurasakorn, K., O'Hare, J.P., Orchard, T.J., Porta, M., Rema, M., Roy, M.S., Sharma, T., Shaw, J., Taylor, H., Tielsch, J.M., Varma, R., Wang, J.J., Wang, N., West, S., Xu, L., Yasuda, M., Zhang, X., Mitchell, P., Wong, T.Y., Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group (2012). Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 35(3), 556–64. <https://doi.org/10.2337/dc11-1909>
- Yi, Q.Y., Deng, G., Chen, N., Bai, Z.S., Yuan, J.S., Wu, G.H., Wang, Y.W., Wu, S.J. (2016). Metformin inhibits development of diabetic retinopathy through inducing alternative splicing of VEGF-A. *Am. J. Transl. Res.* 8(9), 3947–54.
- Zhan, Y., Li, C., Gao, Q., Chen, J., Yu, S., Liu, S.G. (2015). Association between the rs4753426 polymorphism in MTNR1B with fasting plasma glucose level and pancreatic β -cell function in gestational diabetes mellitus. *Genet. Mol. Res.* 14(3), 8778–85. <https://doi.org/10.4238/2015.August.3.1>
- Zhang, D., Lv, F.L., Wang, G.H. (2018). Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22(16), 5071–76. doi: 10.26355/eurrev_201808_15699.
- Zhang, J., Wu, Y., Jin, Y., Ji, F., Sinclair, S.H., Luo, Y., Xu, G., Lu, L., Dai, W., Yanoff, M., Li, W., Xu, G.T. (2008). Intravitreal Injection of Erythropoietin Protects both Retinal Vascular and Neuronal Cells in Early Diabetes. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 49(2), 732-42. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0721>
- Zhang, Q., Cunha, A.P. da, Li, S., Hao, Q., Kainz, V., Huang, Q., Wu, H.Y. (2019). IL-27 regulates HIF-1 α -mediated VEGFA response in macrophages of diabetic retinopathy patients and healthy individuals. *Cytokine* 113, 238–47. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.011>
- Zheng, L., Du, Y., Miller, C., Gubitosi-Klug, R.A., Kern, T.S., Ball, S., Berkowitz, B.A. (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 50(9), 1987–96. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0734-9>

- Zheng, L., Kern, T.S. (2009). Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front. Biosci.* 14, 3974–87. <https://doi.org/10.2741/3505>
- Zheng, W., Reem, R.E., Omarova, S., Huang, S., DiPatre, P.L., Charvet, C.D., Curcio, C.A., Pikuleva, I.A. (2012). Spatial Distribution of the Pathways of Cholesterol Homeostasis in Human Retina. *PLoS One* 7(5), e37926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037926>
- Zheng, Y., Wang, Y.G., Jiang, X., Zhou, S., Wang, Y.H., Cai, L., Zhang, Z., Li, F. (2014). The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9305-9>
- Zhou, J., Wang, D., Luo, X., Jia, X., Li, M., Laudon, M., Zhang, R., Jia, Z. (2018). Melatonin Receptor Agonist Piromelatine Ameliorates Impaired Glucose Metabolism in Chronically Stressed Rats Fed a High-Fat Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 364(1), 55–69. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.243998>
- Zibolka, J., Bazwinsky-Wutschke, I., Mühlbauer, E., Peschke, E. (2018). Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. *J. Pineal Res.* 65(1), e12480. <https://doi.org/10.1111/jpi.12480>
- Zibolka, J., Mühlbauer, E., Peschke, E. (2015). Melatonin influences somatostatin secretion from human pancreatic δ -cells via MT1 and MT2 receptors. *J. Pineal Res.* 58(2), 198–209. <https://doi.org/10.1111/jpi.12206>
- Zong, H., Ward, M., Stitt, A.W. (2011). AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr. Diab. Rep.* 11(4), 244–52. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0198-7>

Biografija kandidata

Branka S. Đorđević, rođena je 04. oktobra. 1983. godine u Knjaževcu. Živi u Nišu, udata je i majka je trogodišnjeg dečaka.

Osnovnu školu i „Gimnaziju”, završila je u Knjaževcu sa odličnim uspehom, kao dobitnik Vukove diplome. Studije na Medicinskom fakultetu u Nišu (studijaska grupa medicina) upisala je školske 2002/03. godine, a diplomirala aprila 2009. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske akademske studije, smer molekularna medicina na Medicinskom fakultetu u Nišu upisala je 2009/10. godine. Treću godinu doktorskih akademskih studija, smer medicinske nauke, upisala je 2017/18. godine. Za vreme trajanja doktorskih akademskih studija položila sve predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9,85.

Branka S. Đorđević izabrana je 2012. godine u zvanje saradnika u nastavi na Katedri za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu, a zatim 2014. godine u zvanje asistenta, za užu naučnu oblast Biohemija. Angažovana je kao istraživač na projektu III43012 finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, rukovodioca prof. dr Dušana Sokolovića. Autor je i koautor 9 radova u časopisima kategorije M20 i 7 radova u časopisima kategorije M50, a rezultate istraživanja prezentovala je na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Član je Biohemijskog društva Srbije i FEBS-a (engl. The Federation of European Biochemical Societies).

Naučni doprinos doktorske disertacije

Naučni doprinos ove doktorske disertacije predstavljaju sledeći radovi:

1. Djordjevic B, Cvetkovic T, Stoimenov TJ, Despotovic M, Zivanovic S, Basic J, Veljkovic A, Velickov A, Kocic G, Pavlovic D, Sokolovic D. Oral supplementation with melatonin reduces oxidative damage and concentrations of inducible nitric oxide synthase, VEGF and matrix metalloproteinase 9 in the retina of rats with streptozotocin/nicotinamide induced pre-diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2018;833:290-297. (M22, IF5 2.914)

2. Đorđević B, Sokolović D, Cvetković T, Jevtović-Stoimenov T, Despotović M, Veljković A, Bašić J, Đukić D, Stević N, Veličkov V, Milenković J, Milošević S. Effects od metformin on parametrs of oxidative damage in the retina of rats with impaired glucose tolerance. *Acta Medica Medianae* 2017;56(4):75-82. (M51)

3. Djordjevic B, Sokolovic D, Basic J, Veljkovic A, Despotovic M, Cvetkovic T, Jevtovic Stoimenov T, Djukic D, Zivkovic N. Relationship between tumor necrosis factor- α and insulin sensitivity in rats with impaired glucose tolerance. *FEBS 3+ Meeting and 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society, Book of Abstracts, September 16-19, Portoroz, Slovenia 2015:248.* (M34)

Izjava 1.

IZJAVA O AUTORSTVU

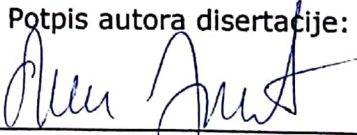
Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom **Efekat melatonina na parametre oksidativnog oštećenja, inflamacije i neoangiogeneze u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 izazvanim steptozotocin-nikotinamidom**, koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivao/la na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredio/la autorska prava, niti zloupotrebio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



Branka S. Đorđević

Izjava 2.

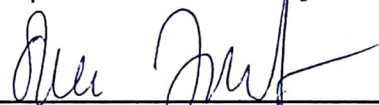
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA DOKTORSKE DISERTACIJE

**Naslov disertacije: Efekat melatonina na parametre oksidativnog oštećenja,
inflamacije i neoangiogeneze u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2
izazvanim streptozotocin-nikotinamidom**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predao/la
za unošenje u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom obliku.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



Branka S. Đorđević

Izjava 3.

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom: **Efekat melatonina na parametre oksidativnog oštećenja, inflamacije i neoangiogeneze u retini pacova sa dijabetesom melitusom tip 2 izazvanim steptozotocin-nikotinamidom.**

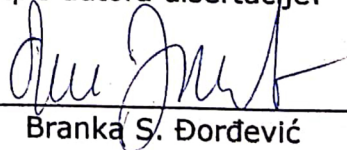
Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo **(CC BY)**
2. Autorstvo – nekomercijalno **(CC BY-NC)**
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade **(CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima **(CC BY-NC-SA)**
5. Autorstvo – bez prerade **(CC BY-ND)**
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima **(CC BY-SA)¹**

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



Branka S. Đorđević