

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Ивана М. Ресановић

**Утицај терапије кисеоником под хипербаричним
условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и
регулацију експресије и активности
индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима
пацијената са инсулин-зависним дијабетесом**

Докторска дисертација

Београд, 2019.

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana M. Resanović

**Uticaj terapije kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima na
nivo i sastav masnih kiselina u plazmi, i regulaciju ekspresije i
aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze u limfocitima
pacijenata sa insulin-zavisnim dijabetesom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana M. Resanović

**Effect of hyperbaric oxygen therapy on level and composition
of fatty acid in plasma, and regulation of expression and
activity of inducible nitric oxide synthase in lymphocytes of
patients with insulin-dependent diabetes**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Ivane Resanović,
izabrana je u sastavu:

dr Božidarka Zarić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu- Institut za nuklearne
nauke „Vinča”

dr Jelena Đorđević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu- Biološki fakultet

dr Zoran Gluvić, docent, Kliničko-bolnički centar Zemun, Univerzitet u Beogradu-
Medicinski fakultet

Datum i mesto javne odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u okviru projekta 173033 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Esmę R. Isenović, naučnog savetnika.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Esmi R. Isenović na ukazanom poverenju, iskrenoj podršci i neprocenjivoj pomoći u mom stručnom usavršavanju, kao i na sveukupnom zalaganju od samog početka naše saradnje.

Zahvaljujem se dr Božidarki Zarić, koja je uvek verovala u mene i pružala mi bezrezervnu podršku i dragocene savete, ulažući veliku energiju i strpljenje tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Jeleni Đorđević na velikodušnoj podršci, stručnoj pomoći, velikom trudu i energiji koju je uložila pri pregledu i oceni ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Zoranu Gluviću na izuzetnoj stručnoj pomoći, neizmernoj podršci, dragocenim savetima i prijateljstvu, koji su mi pomogli da istrajem.

Iskreno se zahvaljujem kolegini dr Emini Sudar Milovanović na neizmernom strpljenju, izuzetnoj stručnoj pomoći, dragocenim savetima i podršci koje je pružala u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Najtoplije se zahvaljujem kolegama i saradnicima na projektu: dr Vladanu Bajiću, dr Sanji Soskić, dr Milanu Obradoviću, dr Sonji Zafirović, dr Aleksandri Jovanović, dr Julijani Stanimirović i MSc Anastasiji Panić koji su svojom kolegijalnošću, optimizmom i vedrim duhom doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta za medicinska istraživanja, Instituta za primenu nuklearne energije, kao i stručnom osoblju i lekarima Kliničko-bolničkog centra Zemun, koji su pomogli u realizaciji eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, suprugu Nemanji i sinu Janku na bezuslovnoj ljubavi, poverenju, podršci i razumevanju koje su mi pružali u svakom trenutku, pomogavši mi da istrajem i ostvarim sve u šta verujem. Ovu disertaciju posvećujem njima.

Ivana Resanović

Uticaj terapije kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima na nivo i sastav masnih kiselina u plazmi, i regulaciju ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze u limfocitima pacijenata sa insulin-zavisnim dijabetesom

Sažetak

Insulin-zavisni dijabetes (IDDM, *engl. Insulin-Dependant Diabetes Mellitus*) se definiše kao stanje hronične hiperglikemije, odnosno povišene koncentracije glukoze u krvi uzrokovane poremećajem sekrecije hormona insulina. Hiperglikemija doprinosi disfunkciji endotela krvnih sudova, što dovodi do vaskularnih komplikacija i tkivne hipoksije. Uzimajući u obzir da poremećen balans kiseonika u plazmi ima važnu ulogu u patogenezi DM, primena terapije kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima (HBK) je preporučena kako bi se usporio razvoj vaskularnih komplikacija. Terapija HBK ostvaruje antiaterogene, antioksidativne i kardioprotektivne efekte utičući na promenu nivoa i sastava masnih kiselina (MK), kao i prenos signala kroz membrane, narušen hiperglikemijom i hipoksijom. Pokazano je da HBK utiče na signalne molekule preko kojih insulin ostvaruje dejstvo, kao što su: supstrat receptora za insulin 1 (IRS-1, *engl. Insulin Receptor Substrate*), fosfatidilinozitol 3 kinaza (PI3K, *engl. Phosphatidylinositide 3 Kinase*), protein kinaza B (Akt, *engl. Protein Kinase B*), kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2 (ERK1/2, *engl. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2*), nuklearni faktor kappa B (NFκB) i inducibilna azot-monoksid-sintaza (iNOS, *engl. Inducible Nitric Oxide Synthase*), i tako ostvaruje antiinflamatorne efekte kod pacijenata sa DM.

U ovoj doktorskoj disertaciji učestvovalo je 28 pacijenata kojima je postavljena dijagnoza IDDM sa vaskularnim komplikacijama. Terapija HBK je podrazumevala izlaganje ispitanika 100% kiseoniku pod pritiskom do 2,4 apsolutnih atmosfera (ATA) u hiperbaričnoj komori u trajanju od jednog sata dnevno, tokom 10 tretmana. Pre početka i nakon tretmana HBK sakupljeni su uzorci krvi ispitanika, iz kojih su izolovani plazma, serum, i limfociti. Iz uzoraka krvi pacijenata mereni su nivo HbA1c, glikemija, koncentracija insulina, lipida, fosfolipida, slobodnih MK (SMK), C-reaktivnog proteina (CRP), azot-monoksida (NO, *engl. Nitric Oxide*), homocisteina (Hcy), kao i aktivnost arginaze. Primenom metode gasne hromatografije meren je udeo pojedinačnih MK u plazmi. Western blot metodom određivan je nivo iNOS, fosforilisanog NFκB-p65,

ukupnog NF κ B-p65, fosforilisanog IRS-1, ukupnog IRS-1, p85 i p110 subjedinica PI3K, fosforilisane Akt, ukupne Akt, fosforilisane ERK1/2 i ukupne ERK1/2 u limfocitima, kao i IGFBP-1 u serumu. Dobijeni rezultati su analizirani korišćenjem Studentovog *t*-testa, kao i Spermanovog i Pirsonovog testa.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da terapija HBK snižava koncentraciju glukoze, insulina, lipida, CRP i NO, i povećava aktivnosti arginaze u krvi pacijenata sa IDDM. Terapija HBK smanjuje nivo proinflamatornih MK, kao što su stearinska, α -linoleinska i linolna kiselina, i povećava nivo antiinflamatornih MK, kao što su palmitoleinska, dokozahexaenoinska, dokozapentaenoinska kiseline, ali i nivo palmitinske kiseline u plazmi. Takođe, terapija HBK smanjuje ekspresiju i aktivnost iNOS, kao i ekspresiju NF κ B-p65, dok se fosforilacija NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶ povećava u limfocitima pacijenata sa IDDM. Pod uticajem terapije HBK dolazi i do smanjenja ekspresije i fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷, ekspresije Akt i fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³, ekspresije ERK1/2 i fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, a povećanja ekspresije subjedinica p85 i p110 PI3K i fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ u limfocitima. Osim toga HBK dovodi do povećanja ekspresije IGFBP-1 u serumu pacijenata sa IDDM.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da terapija HBK ostvaruje antiinflamatorne i antiaterogene efekte mehanizmom koji uključuje promene u sastavu MK plazme i smanjenje ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM, i to mehanizmom koji uključuje smanjenje aktivacije ERK, delimičnu aktivaciju Akt i posledično smanjenje aktivacije NF κ B-p65 u limfocitima pacijenata sa IDDM. Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom doprinose boljem sagledavanju molekularnih mehanizama kojima terapija HBK utiče na promenu nivoa i sastava MK plazme, kao regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM.

Ključne reči: HBK, DM, vaskularne komplikacije, MK, iNOS

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija

UDK broj:

Effect of hyperbaric oxygen therapy on level and composition of fatty acid in plasma, and regulation of expression and activity of inducible nitric oxide synthase in lymphocytes of patients with insulin-dependent diabetes

Abstract

Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is defined as a condition of a chronic hyperglycemia, i.e. elevated blood glucose level caused by impaired secretion of the hormone insulin. Hyperglycemia contributes to endothelial dysfunction, leading to vascular complications and tissue hypoxia. Given that impaired oxygen balance in plasma plays an important role in the pathogenesis of DM, administration of hyperbaric oxygen (HBO) therapy has been recommended to slow the development of vascular complications. HBO therapy exerts anti-atherogenic, antioxidant, and cardioprotective effects by altering the level and composition of plasma fatty acids (FA), thereby promoting signal transduction through the membrane, which is impaired by hyperglycemia and hypoxia. Also, the literature indicates that HBO affects molecules involved in the mechanism of insulin action, such as insulin receptor substrate (IRS-1), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), as well as deactivation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), nuclear factor kappa B (NFκB), and inducible nitric oxide synthase (iNOS), thus exerts anti-inflammatory effects in patients with DM.

This doctoral dissertation involved 28 patients with diagnosed IDDM and vascular complications. HBO treatment implies therapeutic inhalation of 100% oxygen under elevated pressure up to 2.4 absolute atmospheres in a hyperbaric chamber for one hour per day, during 10 treatments. Blood samples were collected from IDDM patients, and separated into plasma, serum and lymphocytes before starting therapy and after 10th HBO treatment. Blood samples from IDDM patients were used for the measurement of HbA1c and glycemic levels, the concentration of insulin, lipids, phospholipid, free FA (FFA), C-reactive protein (CRP), nitric oxide (NO), homocysteine (Hcy), as well as for arginase activity. Gas chromatography method was used for measurement of the content of individual FA in plasma. Western blot method was used for measurement of expression of iNOS, phosphorylated NFκB-p65, total NFκB-p65, phosphorylated IRS-1,

total IRS-1, p85 and p110 subunits of PI3K, phosphorylated Akt, total Akt, phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2 in lymphocytes, and level of IGFBP-1 in the serum. The results were analyzed using Student's t-test, Spearman's and Pearson's test.

The results presented in this doctoral dissertation show that HBO therapy decreases concentration of glucose, insulin, lipids, CRP, and NO, and increases arginase activity in the blood of IDDM patients. HBO therapy lowers plasma levels of proinflammatory FA, such as stearic, linoleic acid and α -linolenic, and increases levels of anti-inflammatory FA, such as palmitoleic acid, docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and palmitic acid. HBO therapy also reduces the expression and activity of iNOS proteins in lymphocytes, as well as the expression of NF κ B-p65 and increase phosphorylation of NF κ B-p65 at Ser⁵³⁶ in IDDM patient's lymphocytes. Furthermore, HBO therapy influenced the reduction of the expression and phosphorylation of IRS-1 on Ser³⁰⁷, decrease expression of Akt and phosphorylation of Akt on Ser⁴⁷³, expression of ERK1/2 and phosphorylation of ERK1/2 on Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, and increase expression of subunits p85 and p110 PI3K, phosphorylation of Akt on Thr³⁰⁸ in lymphocytes. HBO therapy, also, increased the level of IGFBP-1 in the serum.

Based on the findings of this doctoral dissertation, it can be concluded that HBO therapy exerts anti-inflammatory and anti-atherogenic effects by a mechanism involving changes in plasma FA level and composition, as well as reduction of the expression and activity of iNOS in lymphocytes of IDDM patients, by mechanisms involving decreased ERK activation and partial activation of Akt leading to decreased activation of NF κ B-p65 in lymphocytes of IDDM patients. The research findings included in this doctoral dissertation contributed to the better understanding of the molecular mechanisms by which HBO therapy influences changes in the level and composition of FA in plasma, as well as a regulation of iNOS expression and activity in lymphocytes of IDDM patients.

Key Words: HBO, DM, vascular complications, FA, iNOS

Scientific Group: Biology

Specific Area within a Group: Molecular Endocrinology

UDK number:

Spisak skraćenica

A.J.	arbitrarna jedinica (<i>engl. Arbitrary Unit</i>)
ADA	američka asocijacija za dijabetes (<i>engl. American Diabetes Association</i>)
AGE	krajnji produkti glikozilacije (<i>engl. Advance Glycation End-products</i>)
Akt	protein kinaza B (<i>engl. Protein Kinase B</i>)
ALP	alkalna fosfataza (<i>engl. Alkaline Phosphatase</i>)
APS	amonijumpersulfat
ATA	apsolutna atmosfera
BCIP/NBT	reagens (<i>engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i>)
BH4	tetrahidrobiopterin (<i>engl. Tetrahydrobiopterin</i>)
BMI	indeks telesne mase (<i>engl. Body Mass Index</i>)
BSA	albumin goveđeg seruma (<i>engl. Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺	jon kalcijuma
CaM	kalmodulin
cPLA2	citoplazmatska fosfolipaza A2 (<i>engl. Cytosolic Phospholipase A2</i>)
CPT-1	karnitinska palmitoiltransferaza (<i>engl. Carnitine Palmitoyltransferase-1</i>)
CRP	c-reaktivni protein
DCCT	studija o kontroli i komplikacijama dijabetesa (<i>engl. Diabetes Complications and Control Trial</i>)
DDC	dietilditiokarbamat (<i>engl. Diethyl-Dithiocarbamate</i>)
DM	šećerna bolest (<i>lat. Diabetes Mellitus</i>)
DMT1	šećerna bolest tipa 1 (<i>engl. Diabetes Mellitus Type 1</i>)
DMT2	šećerna bolest tipa 2 (<i>engl. Diabetes Mellitus Type 2</i>)
DNA-PK	DNK zavisne protein kinaze (<i>engl. DNA-Dependent Protein Kinase</i>)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ECL	pojačana hemiluminiscencija (<i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDIC	studija o epidemiologiji intervencija i komplikacijama dijabetesa (<i>engl. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>)

EDTA	etilendiaminotetrasirćetna kiselina (<i>engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
eNOS	endotelna NOS (<i>engl. Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
ERK1/2	kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2 (<i>engl. Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2</i>)
FAD	flavin adenin dinukleotid
FAS	sintaza masnih kiselina (<i>engl. Fatty Acid Synthase</i>)
FMN	flavin mononukleotid
FPIA	fluorescentna polarizaciona imunoanaliza
GAD65	antitela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (<i>engl. Glutamic Acid Decarboxylase</i>)
GDP	guanozin difosfat (<i>engl. Guanosine Diphosphate</i>)
GH	hormon rasta (<i>engl. Growth Hormone</i>)
GLUT4	transporter za glukozu tipa 4 (<i>engl. Glucose Transporters Type 4</i>)
GPR	receptori spregnuti sa G proteinom (<i>engl. G protein-coupled receptors</i>)
Grb2	protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta (<i>engl. Growth Factor Receptor-Bound protein 2</i>)
GTP	guanozin trifosfat (<i>engl. Guanosine Triphosphate</i>)
GWAS	studije o genomskim asocijacijama (<i>engl. Genome-Wide Association Studies</i>)
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
Hb	hemoglobin
HbA1c	glikozilovani hemoglobin
HBK	kiseonik pod hiperbaričnim uslovima
HDL	lipoprotein velike gustine (<i>engl. High-Density Lipoprotein</i>)
HHcy	hiperhomocisteinemija
HRP	peroksidaza rena (<i>engl. Horse Radish Peroxidase</i>)
HTA	arterijska hipertenzija
IAA	antitela na insulin (<i>engl. Insulin Autoantibody</i>)
ICA	antitela na Langerhansova ostrvca (<i>engl. Islet Cell Antibody</i>)

IDDM	insulin-zavisni oblik dijabetesa (<i>engl. Insulin-Dependant Diabetes Mellitus</i>)
IDF	međunarodna federacija za dijabetes (<i>engl. International Diabetes Federation</i>)
IFN γ	interferon gama
IGF-1	faktor rasta sličan insulinu 1 (<i>engl. Insulin-like Growth Factor</i>)
IGFBP	protein koji vezuje IGF (<i>engl. Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>)
IL	interleukin
iNOS	inducibilna NOS (<i>engl. Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
IR	rezistencija na insulin (<i>engl. Insulin Resistance</i>)
IRF-1	regulatorni faktor interferona 1 (<i>engl. Interferon Regulatory Factor</i>)
IRS-1	supstrat receptora za insulin 1 (<i>engl. Insulin Receptor Substrate 1</i>)
ISPF	isonitrosopropiofenon
IUPAC	međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (<i>engl. International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
I κ B	inhibitorni protein NF κ B (<i>engl. Inhibitor of NFκB</i>)
I κ K	kinaza inhibitora κ B (<i>engl. IκB Kinase</i>).
KBC	kliničko-bolnički centar
KVB	kardiovaskularne bolesti
KVS	kardiovaskularni sistem
LDL	lipoprotein male gustine (<i>engl. Low-Density Lipoprotein</i>)
LPS	lipopolisaharid
LSM	reagens za razdvajanje limfocita (<i>engl. Lymphocyte Separation Medium</i>)
MAPK	mitogenom-aktivirane protein kinaze
mtNOS	mitohondrijska NOS (<i>engl. Mitochondrial Nitric Oxide Synthase</i>)
mTORC2	kompleks ciljnog molekula za rapamicin 2 kod sisara (<i>engl. Mammalian Target of Rapamycin Complex 2</i>)
MAPK	protein kinaze aktivirane mitogenima
MAPKK	kinaza MAPK
MUFA	nezasićene masne kiseline sa jednom dvostrukom vezom (<i>engl. Mono-</i>

Unsaturated Fatty Acids)

NADH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid (<i>engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (<i>engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NFκB	nuklearni faktor κB (<i>engl. Nuclear Factor kappa B</i>)
NIDDM	insulin-nezavisni oblik dijabetesa (<i>engl. Non-Insulin-Dependant Diabetes Mellitus</i>)
NK ćelije	ćelije prirodne ubice (<i>engl. Natural Killer Cells</i>)
nNOS	neuronska NOS (<i>engl. Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>)
NO	azot-monoksid (<i>engl. Nitric Oxide</i>)
NO ₂ ⁻	nitrit
NO ₃ ⁻	nitrat
NOS	azot-monoksid-sintaza (<i>engl. Nitric Oxide Synthase</i>)
O ₂	molekulski kiseonik
O ₂ ⁻	superoksid anjon
OGTT	test oralnog opterećenja glukozom (<i>engl. Oral Glucose Tolerance Test</i>)
ONOO ⁻	peroksinitrit
PDK1	fosfoinozimid-zavisna protein kinaza 1 (<i>engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1</i>)
PGC-1α	koaktivator receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma 1α (<i>engl. Peroxisome Proliferator Gamma Coactivator-1α</i>)
PH	domen homolog plekstrinu (<i>engl. Pleckstrin Homology Domain</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3 kinaza (<i>engl. Phosphatidylinositol 3 Kinase</i>)
PIKK	kinaza povezana sa PI3K (<i>engl. PI3K-related kinase</i>)
PIP2	fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfat (<i>engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisPhosphate</i>)
PIP3	fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat (<i>engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>)
PKC	protein kinaza C
PPAR	receptor aktivacije proliferacije peroksizoma (<i>engl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)

PUFA	masne kiseline sa više dvostrukih veza (<i>engl. Poly-Unsaturated Fatty Acid</i>)
PVDF	poliviniliden fluorid membrana (<i>engl. Polyvinylidene Difluoride</i>)
Raf	kinaza kinaze MAPK
Ras	mali GTP vezujući protein
RIA	radioimunološka metoda (<i>engl. Radioimmunoassay</i>)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (<i>engl. Reactive Oxygen Species</i>)
RSK	ribozomalna S6 kinaza (<i>engl. Ribosomal S6 Kinase</i>)
SCD	stearoil-koenzim A desaturaze ili $\Delta 9$ desaturaza (<i>engl. Stearoyl-CoA desaturase</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat (<i>engl. Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS (<i>engl. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Ser	serin
SFA	zasićene masne kiseline (<i>engl. Saturated Fatty Acids</i>)
SH2	Src homolog 2 domen (<i>engl. Src homology 2</i>)
Shc	protein koji sadrži SH2
SLS	natrijum lauril sulfat (<i>engl. Sodium Lauryl Sulfate</i>)
SMK	slobodna masna kiselina (<i>engl. Free Fatty Acid</i>)
SOS	izmenjivač guaninskih nukleotida (<i>engl. Son Of Sevenless</i>)
SPSS	statistički program za društvene nauke (<i>engl. Statistical Package for the Social Sciences</i>)
TEA	trietanolaminski pufer
Tg	trigliceridi (<i>engl. Triglycerides</i>)
Thr	treonin
TNF α	faktor nekroze tumora alfa (<i>engl. Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
Tyr	tirozin
UKPDS	britanska prospektivna studija o dijabetesu (<i>engl. United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>)
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela (<i>engl. Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

VLDL	lipoprotein vrlo male gustine (<i>engl. Very Low-Density Lipoprotein</i>)
VSMC	glatke mišićne ćelije vaskulature (<i>engl. Vascular Smooth Muscle Cells</i>)
WHO	svetska zdravstvena organizacija (<i>engl. World Health Organization</i>)
ZnT8	antitela na transporter 8 cinka

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Šećerna bolest (DM)	1
1.1.1. Definicija, podela i epidemiologija DM.....	1
1.1.2. Etiologija i dijagnostika insulin-zavisnog DM (IDDM)	2
1.2.1. Molekulski mehanizmi delovanja insulina u fiziološkim uslovima.....	6
1.2.2. Molekulski mehanizmi delovanja insulina u patofiziološkim uslovima	10
1.3. Masne kiseline (MK)- opšte osobine, struktura i funkcija.....	11
1.3.1. Podela i nomenklatura MK.....	12
1.3.2. Biosinteza MK.....	13
1.3.3. Uloga MK u razvoju DM	16
1.4. Azot-monoksid (NO) i azot-monoksid-sintaze (NOS)	18
1.4.1. Inducibilna azot-monoksid-sintaza (iNOS) - građa i funkcija	21
1.4.2. Molekulski mehanizmi regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS	23
1.4.3. Uloga iNOS u razvoju DM i vaskularnih komplikacija	25
1.5. Vaskularne komplikacije kod pacijenata sa IDDM	27
1.5.1. Mehanizam nastanka vaskularnih komplikacija.....	27
1.5.2. Faktori rizika za nastanak vaskularnih komplikacija kod pacijenata sa IDDM.....	29
1.5.3. Dijagnoza vaskularnih komplikacija	31
1.6. Terapija u lečenju DM i vaskularnih komplikacija kod obolelih od DM.....	31
1.6.1. Primena terapije kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima (HBK) u lečenju vaskularnih komplikacija kod obolelih od DM.....	32
2. HIPOTEZA.....	35
3. CILJEVI RADA	36
4. MATERIJAL I METODE	37
4.1. Dizajn istraživanja i način izbora ispitanika	37
4.2. Postupak regrutovanja ispitanika	38
4.3. Terapija HBK.....	39
4.4. Metode rada	39
4.4.1. Određivanje antropometrijskih parametara	39
4.4.2. Merenje krvnog pritiska	39
4.4.3. Određivanje biohemijskih parametara.....	40
4.4.3.1. Izdvajanje seruma i plazme iz krvi pacijenata sa IDDM.....	40

4.4.3.2.	Hematološke analize pacijenata sa IDDM	40
4.4.3.3.	Određivanje koncentracije parametara metabolizma glukoze.....	40
4.4.3.3.1.	Određivanje nivoa glikozilovanog hemoglobina (HbA1c) u krvi pacijenata sa IDDM	40
4.4.3.3.2.	Određivanje glikemije pacijenata sa IDDM	41
4.4.3.3.3.	Određivanje koncentracije insulina u serumu pacijenata sa IDDM	42
4.4.3.4.	Određivanje koncentracije parametara lipidnog profila	42
4.4.3.5.	Određivanje koncentracije fosfolipida u plazmi pacijenata sa IDDM	43
4.4.3.6.	Određivanje koncentracije slobodnih MK (SMK) u plazmi pacijenata sa IDDM	44
4.4.3.7.	Određivanje nivoa pojedinačnih MK u plazmi pacijenata sa IDDM	44
4.4.3.8.	Određivanje aktivnosti elongaze i desaturaza MK.....	45
4.4.3.9.	Određivanje koncentracije markera inflamacije.....	46
4.4.3.9.1.	Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu pacijenata sa IDDM	46
4.4.3.9.2.	Određivanje koncentracije homocisteina (Hcy) u plazmi pacijenata sa IDDM	46
4.4.3.9.3.	Određivanje koncentracije nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-) u serumu kao krajnjih produkata NO.....	47
4.4.3.10.	Određivanje aktivnosti arginaze u serumu pacijenata sa IDDM.....	48
4.4.4.	Izolacija limfocita iz krvi pacijenata sa IDDM	49
4.4.5.	Analiza ekspresije proteina iz lizata limfocita	50
4.4.5.1.	Izolacija ukupnih proteina iz lizata limfocita pacijenata sa IDDM.....	50
4.4.5.2.	Određivanje koncentracije proteina iz lizata limfocita i seruma pacijenata sa IDDM	50
4.4.5.3.	Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	51
4.4.5.4.	Western blot	52
4.4.6.	Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata.....	55
5.	REZULTATI.....	56
5.1.	Demografski podaci pacijenata sa IDDM.....	57
5.2.	Antropometrijski i klinički parametri pacijenata sa IDDM	57
5.3.	Hematološki parametri pacijenata sa IDDM.....	58
5.4.	Parametri metabolizma glukoze u krvi pacijenata sa IDDM	59
5.4.1.	Nivo HbA1c u krvi pacijenata sa IDDM.....	59

5.4.2.	Uticaoj terapije HBK na glikemiju pacijenata sa IDDM	60
5.4.3.	Uticaoj terapije HBK na koncentraciju insulina u serumu pacijenata sa IDDM.....	61
5.5.	Uticaoj terapije HBK na parametre lipidnog statusa pacijenata sa IDDM	62
5.6.	Uticaoj terapije HBK na koncentraciju fosfolipida i SMK u plazmi pacijenata sa IDDM.....	65
5.7.	Uticaoj terapije HBK na nivo MK u plazmi pacijenata sa IDDM.....	66
5.8.	Uticaoj terapije HBK na koncentraciju markera inflamacije u krvi pacijenata sa IDDM.....	69
5.8.1.	Uticaoj terapije HBK na koncentraciju CRP u serumu pacijenata sa IDDM.....	69
5.8.2.	Koncentracija Hcy u plazmi ispitanika pre i posle terapije HBK	70
5.8.3.	Uticaoj terapije HBK na koncentraciju NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ u serumu pacijenata sa IDDM	71
5.9.	Uticaoj terapije HBK na aktivnost arginaze u serumu pacijenata sa IDDM	71
5.10.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM	72
5.11.	Uticaoj terapije HBK na nivo signalnih molekula uključenih u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM.....	74
5.11.1.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju NFκB-p65 transkripcionog faktora u limfocitima pacijenata sa IDDM	74
5.11.2.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju IRS-1 u limfocitima pacijenata sa IDDM	76
5.11.3.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju subjedinica p85 i p110 PI3K u limfocitima pacijenata sa IDDM.....	77
5.11.4.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju Akt u limfocitima pacijenata sa IDDM	78
5.11.5.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju ERK1/2 u limfocitima pacijenata sa IDDM	81
5.12.	Uticaoj terapije HBK na ekspresiju IGFBP-1 u serumu pacijenata sa IDDM.....	83
6.	DISKUSIJA	84
7.	ZAKLJUČCI	101
8.	LITERATURA	103

1. Uvod

1.1. Šećerna bolest (DM)

1.1.1. Definicija, podela i epidemiologija DM

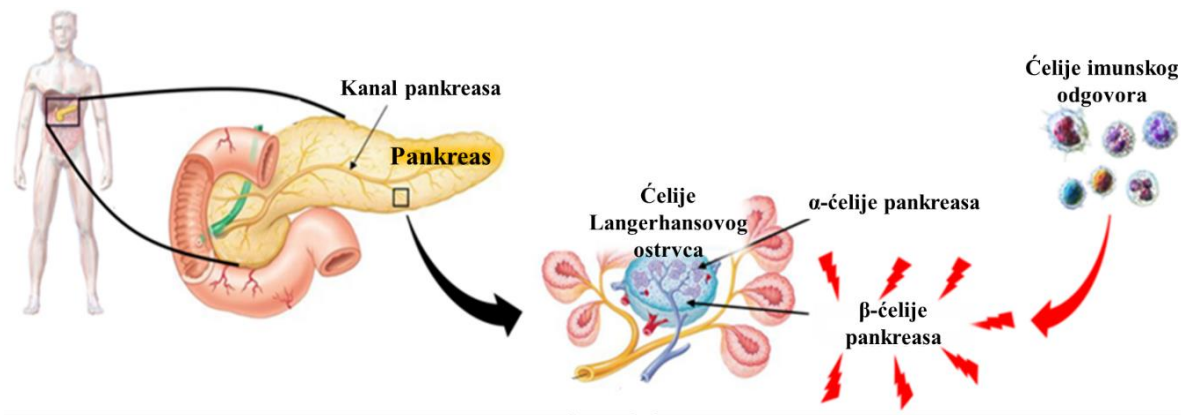
Šećerna bolest (DM, *lat. Diabetes mellitus*) jedno je od najčešćih hroničnih endokrinoloških oboljenja, koje predstavlja globalni zdravstveni problem 21. veka. Definiše se kao stanje hronično visoke koncentracije glukoze u krvi (hiperglikemija) uzrokovano poremećajem sekrecije hormona insulina ili smanjenim biološkim delovanjem insulina, što dovodi do poremećaja u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i proteina (Punthakee i sar., 2018). Hiperglikemija, takođe, uzrokuje disfunkciju endotela krvnih sudova, koja dovodi do hronične angiopatije u vidu mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija, i posledične hipoksije tkiva (Rahman i sar., 2007).

Ranija klasifikacija DM iz 1979. godine, kojom su razdvojeni tipovi DM prema kliničkim karakteristikama i vrsti terapije, obuhvata dve osnovne kategorije: insulin-zavisni DM (IDDM, *engl. Insulin-Dependant Diabetes Mellitus*) i insulin-nezavisni oblik DM (NIDDM) (National Diabetes Data Group, 1979). Danas se češće koristi etiopatogenetska klasifikacija DM iz 1995. godine, koja obuhvata najmanje četiri osnovne kategorije: DM tip 1 (DMT1), DM tip 2 (DMT2), drugi specifični oblici DM i gestacijski DM (Gavin, 1998). DMT1 nastaje usled destrukcije β -ćelija, posredovane imunskim procesom, što vodi potpunom nedostatku sekrecije insulina, dok DMT2 nastaje kao posledica smanjene sekrecije insulina koji je udružen sa rezistencijom na insulin (IR). U patogenezi DMT1 i DMT2 mogu učestvovati isti patofiziološki procesi, među kojima su apoptoza β -ćelija posredovana imunskim odgovorom, faktorima sredine, poligenetskim nasleđivanjem, gojaznošću i IR (Merger i sar., 2016). Međutim, u kliničkim uslovima se i dalje koriste termini IDDM i NIDDM, uzimajući u obzir da DMT2 u svom prirodnom toku često zahteva bazalnu ili intenzivnu primenu insulina. Prilog tome je i izostanak etiopatogenetske klasifikacije u novijim izdanjima Međunarodne klasifikacije bolesti i povreda (2010).

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO, *engl. World Health Organization*) i Međunarodne federacije za dijabetes (IDF, *engl. International Diabetes Federation*) iz 2016. godine od DM u svetu boluje 415 miliona ljudi tj. svaka 11 osoba. Usled konstantno rastuće prevalence DM predviđa se da će se do 2030. godine broj obolelih od DM udvostručiti (Rowley i sar., 2017). Podaci studija pokazuju da DM zauzima sedmo mesto u nizu vodećih uzroka smrti u svetu usled pratećih vaskularnih komplikacija i kardiovaskularnih bolesti (KVB) (Leon i Maddox, 2015). U našoj zemlji od DM boluje oko 710.000 osoba, od kojih skoro trećina već ima jednu ili više razvijenih vaskularnih komplikacija u momentu postavljanja dijagnoze. U Srbiji godišnje umre oko 3.000 obolelih od DM sa incidencom 15,7 na 100.000 stanovnika, čime se Srbija svrstava u grupu evropskih zemalja sa visokom stopom smrtnosti od ove bolesti (Registar za dijabetes u Srbiji, 2016).

1.1.2. Etiologija i dijagnostika insulin-zavisnog DM (IDDM)

Uzroci kao i mehanizam nastanka IDDM još nisu sasvim poznati, ali se danas smatra da interakcija između faktora okoline (nepravilna ishrana, nedovoljna fizička aktivnost, virusi, toksini itd.) i genetskog nasleđa dovodi do povećane osetljivosti za nastanak IDDM (Atkinson i Maclaren, 1994). Prema najnovijim literaturnim podacima, 15% novodijagnostikovanih IDDM ima najbližeg srodnika obolelog od IDDM (Steck i Rewers, 2016). Podaci studije o genomskim asocijacijama (GWAS, *engl. Genome-Wide Association Studies*) pokazuju da je do danas identifikovano više od 50 genskih lokusa povezanih sa faktorima rizika za nastanak DM (Pociot, 2017). Značajan broj gena na ovim lokusima ekspimiran je u β -ćelijama pankreasa čoveka, i utiču na promenu odgovora β -ćelija na inflamaciju, aktivaciju imunskog sistema, kao i regulaciju apoptoze β -ćelija (Bradfield i sar., 2011). Primećeno je da i kod obolelih od DMT2 može doći do destrukcije β -ćelija posredovane imunskim sistemom, usled čega se javlja potreba za primenom terapije insulinom (**Slika 1.**) (Larsen i sar., 2007; Cleland i sar., 2013). Kod osoba obolelih od DMT1 postoji genetska osnova koja može usloviti razvoj komplikacija vezanih za DM, kao što je na primer razvoj IR, karakteristične za DMT2, koja prethodi destrukciji β -ćelija pankreasa (Chaparro i sar., 2006).



Slika 1. Imunskim odgovorom posredovano uništavanje β -ćelija pankreasa

(preuzeto i modificovano sa <https://www.andrewkoutnik.com/blog/2018/8/22/part-1-what-is-type-1-diabetes>)

Početak nastanka IDDM ne može se jasno definisati, jer ovo oboljenje prolazi kroz različite faze razvoja i počinje mnogo godina pre manifestacije kliničkih znakova. Procenjuje se da oštećenje od 80% do 90% β -ćelija pankreasa dovodi do kliničke manifestacije bolesti, usled čega je nemoguće održati glikemiju u granicama referentnih vrednosti (Atkinson i Maclaren, 1994).

Rezultati brojnih istraživanja su jasno ukazali da je aktivacija imunskog sistema jedan od ključnih događaja u nastanku IDDM, upravo usled insulitisa, infiltracije mononuklearnih ćelija, na prvom mestu makrofaga i T-limfocita, u Langerhansova ostrvca pankreasa (Gepts, 1965; Eisenbarth, 1986). Iz imunskih ćelija sekretuju se inflamatorni citokini, koji zajedno sa faktorima rasta i reaktivnim vrstama kiseonika (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*) doprinose aktivaciji i nagomilavanju ćelija imunskog sistema ("auto-stimulacija" imunskog sistema) i na taj način različitim mehanizmima pokreću apoptozu β -ćelija pankreasa (Federici i sar., 2001; Boni-Schnetzler i sar., 2008). Oštećene β -ćelije oslobađaju antigene na koje imunski sistem stvara specifična autoantitela (Winter i sar., 2002). Biomarkeri autoimunske destrukcije β -ćelija predstavljaju cirkulišuća antitela, koja se u serumu IDDM pacijenata mogu naći i mnogo godina pre pojave hiperglikemije, kao što su: antitela na Langerhansova ostrvca u citoplazmi (ICA, *engl. Islet Cell Antibody*), antitela na insulin (IAA, *engl. Insulin Autoantibody*), antitela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (GAD65, *engl. Glutamic Acid Decarboxylase*), antitela na transporter 8 cinka (ZnT8), kao i antitela na tirozin fosfatazu u Langerhansovim ostrvcima (Pihoker i sar., 2005).

Prema preporukama WHO i IDF standardni metod za dijagnostikovanje DM predstavlja merenje glikemije nakon dvanaestočasovnog gladovanja. Osim toga, primenjuje se i test oralnog opterećenja glukozom (OGTT), kojim se procenjuje odgovor organizma na oralno unetu glukozu (75g glukoze rastvorene u 300 ml vode) i predstavlja određivanje glikemije pre i 120 minuta nakon konzumiranja rastvora glukoze. OGTT se primenjuje kod osoba koji imaju simptome DM (povećana glad, učestalo mokrenje, gubljenje telesne mase) i čije su vrednosti izmerene glikemije bile od 6,1 do 7 mmol/l u uzorku uzetom nakon perioda gladovanja (WHO and IDF, 2006). Međunarodni ekspertski komitet uvrstio je i nivo glikozilovanog hemoglobina (HbA1c, *engl. Hemoglobin A1c*) $\geq 6,5\%$ kao kriterijum za postavljanje dijagnoze DM (WHO and IDF, 2006). HbA1c se definiše kao hemoglobin (Hb) koji je ireverzibilno glikozilovan na jednom ili oba N-terminalna β -globinska lanca u eritrocitima (Bunn i sar., 1976). HbA1c predstavlja pouzdanu meru glikemije, jer odražava prosečnu vrednost glikemije u periodu od 3 do 4 meseca, koliki je i prosečni vek eritrocita (Lyons i Basu, 2012). Osim toga, HbA1c pokazuje veliki afinitet vezivanja kiseonika (O_2), ali smanjenu sposobnost njegovog otpuštanja u krvnim sudovima, zbog čega u perifernim tkivima nastaje stanje smanjene količine O_2 , tj. hipoksija, koja doprinosi razvoju komplikacija u DM (Bunn i sar., 1976). Podaci iz Studije o kontroli i komplikacijama DM (DCCT, *engl. Diabetes Complications and Control Trial*), koja je uključivala ispitanike obolele od DMT1 i Britanske prospektivne studije o DM (UKPDS, *engl. United Kingdom Prospective Diabetes Study*), koja je uključivala ispitanike obolele od DMT2, su pokazali da nivo HbA1c veći od 7% povećava rizik od razvoja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija kod obolelih od DM (2002).

Prema Američkoj asocijaciji za DM (ADA, *engl. American Diabetes Association*) dijagnoza DM se postavlja na osnovu sledećih dijagnostičkih kriterijuma (American Diabetes Association, 2010):

1. Nivo HbA1c u odnosu na ukupni Hb $\geq 6,5\%$ ili
2. Glikemija nakon dvanaestočasovnog gladovanja $\geq 7,0$ mmol/l,
3. Glikemija u toku OGTT (75 g glukoze u 120-om minutu) $\geq 11,1$ mmol/l,
4. Glikemija bez obzira na obrok $\geq 11,1$ mmol/l, uz prisustvo tipičnih simptoma DM, kao što su: poliurija, polidipsija, gubitak telesne mase.

1.2. Molekulski mehanizmi delovanja insulina

Hormon insulin je po hemijskoj strukturi polipeptid sastavljen od 51 aminokiseline koje grade dva polipeptidna lanca (lanac A i lanac B) međusobno povezana disulfidnim vezama (Abel, 1926). Gen za insulin sisara eksprimiran je u β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa, a sinteza insulina regulisana je kako na nivou transkripcije tako i na nivou translacije (Welsh i sar., 1985). U pankreasu se sintetise preproinsulin, prekursor insulina, koji se translocira u endoplazmatski retikulum i oslobađa signalni peptid, čime nastaje proinsulin. Odvajanjem C-peptida od proinsulina nastaje insulin, koji se u formi heksamera (neaktivni oblik) deponuje u vidu vezikula u Goldžijevom aparatu β -ćelija pankreasa (Howell, 1984). Insulin se potom sekretuju u odgovoru na hiperglikemiju, ali i visoku koncentraciju slobodnih masnih kiselina (SMK), aminokiseline ili ketokiseline u krvi, i u formi monomera ostvaruje svoju biološku ulogu na ćeliskom nivou (Biden i Taylor, 1983; Boden i Chen, 1999).

Insulin ima ključnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze i masti, tj. snižava glikemiju, tako što omogućava ulazak glukoze u mišiće, masno tkivo i druga tkiva, stimuliše deponovanje glukoze u vidu glikogena u jetri, podstiče sintezu MK u jetri, stimuliše deponovanje masti u masno tkivo, podstiče sintezu proteina, tako što povećava dostupnost i transport aminokiselina u mišiće, itd. (Saltiel i Kahn, 2001; Fujita i sar., 2006). Takođe, insulin ima važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, tako što stimuliše sintezu snažnog vazodilatatora, azot-monoksida (NO, *engl. Nitric oxide*) ili sintezu endotelina 1, koji doprinosi vazokonstrukciji (Manrique i sar., 2014). Insulin ostvaruje i antiinflamatorne efekte, tako što smanjuje: stvaranje ROS, ekspresiju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze i aktivaciju faktora transkripcije uključenih u inflamatorni odgovor (Dandona i sar., 2001).

Usled oštećenja ili uništenja β -ćelija pankreasa dolazi do smanjenja ili izostanka sekrecije insulina, što za posledicu ima doživotnu zavisnost od egzogenog insulina (Rahman i sar., 2007). Kada se insulin nedovoljno izlučuje dolazi do stanja hiperglikemije, koje dovodi do poremećaja u regulaciji signalnog puta delovanja insulina dovodeći do disfunkcije endotela, nastanka oksidativnog stresa i inflamacije, što rezultira razvojem vaskularnih komplikacija u stanju DM (Sugita i sar., 2002; Fujimoto i sar., 2005; Tanaka i sar., 2009).

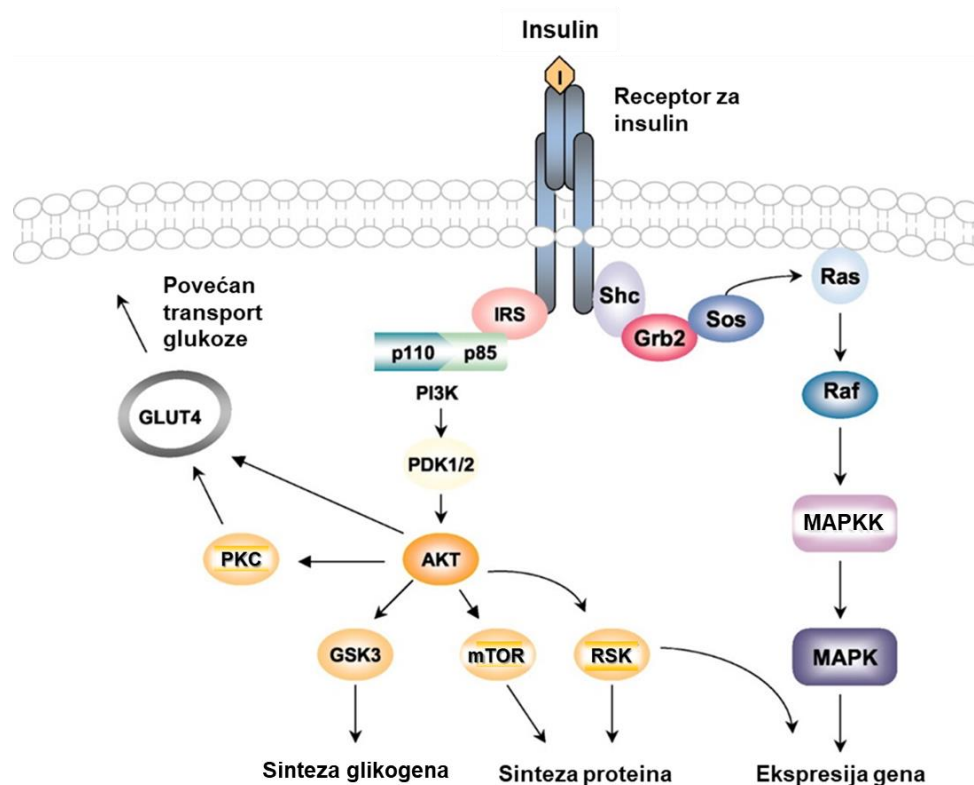
1.2.1. Molekulski mehanizmi delovanja insulina u fiziološkim uslovima

U fiziološkim uslovima, insulin se brzo i reverzibilno vezuje za specifične glikoproteinske receptore za insulin ili insulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1, *engl. Insulin-like Growth Factor*) na membranama ćelija ciljnih tkiva (Tamemoto i sar., 1994; Saltiel i Kahn, 2001), koji pripadaju grupi receptora sa tirozin-kinaznom aktivnošću. Vezivanjem insulina za receptor na plazma membrani dolazi do autofosforilacije receptora na specifičnim Tyr ostacima i sledstvene fosforilacije intracelularnih adaptorskih supstrata, među kojima su i supstrat receptora za insulin 1 (IRS-1, *engl. Insulin Receptor Substrate*) i Shc (White, 2002) (**Slika 2.**). Fosforilisani IRS-1 na Tyr dalje stupa u interakciju sa proteinima koji imaju Src homolog 2 (SH2, *engl. Src homology 2*) domene, kao što je enzim fosfatidilinozitol 3 kinaza (PI3K, *engl. Phosphatidylinositide 3 Kinase*) (Gual i sar., 2005). IRS-1 je ključni molekul u signalnoj kaskadi insulina i ima ulogu u prenosu signala od receptora za insulin do PI3K (Saltiel i Kahn, 2001). IRS-1 protein sadrži domen homolog plekstrinu (PH, *engl. Pleckstrin Homology Domain*) na N-kraju, koji služi za interakciju sa plazma membranom, dok se na C-kraju nalaze brojna mesta fosforilacije na tirozinskim (Tyr), serinskim (Ser) i treoninskim (Thr) ostacima, koji služe za regulaciju funkcije IRS-1 (Gual i sar., 2005). Pokazano je da IRS-1 sadrži oko dvadeset potencijalnih Tyr ostataka na kojima može biti fosforilisan (Langlais i sar., 2011). Do aktivacije IRS-1 dolazi fosforilacijom IRS na Tyr⁶⁰⁸ i Tyr⁶²⁸, čime se omogućava njegova asocijacija sa regulatornom p85 subjedinicom PI3K (Asarian i Geary, 2002). Regulatorna subjedinica p85 se vezuje za fosforilisane Tyr ostatke IRS-1 i nakon toga, interaguje sa katalitičkom p110 subjedinicom PI3K preko SH2 domena, što dovodi do aktivacije p110 i njene translokacije na plazma membrani (Downward, 1998). Aktivirana PI3K stvara fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat (PIP3, *engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), tako što fosforiliše OH grupe na poziciji 3 fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfata (PIP2, *engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*) (Downward, 1998). Proizvod aktivirane PI3K kinaze, PIP3 se dalje vezuje za PH domen na N-kraju protein kinaze B (Akt ili PKB, *engl. Protein Kinase B*), omogućavajući na taj način translokaciju Akt iz citoplazme na plazma membranu, gde se fosforiliše i time aktivira Akt (Cantrell, 2001; Scheid i sar., 2002). Za aktivaciju Akt, neophodna je fosforilacija ove kinaze na Thr³⁰⁸ koji se nalazi u katalitičkom domenu i Ser⁴⁷³ koji se nalazi u regulatornom domenu Akt. Fosfoinozitud-zavisna protein kinaza 1 (PDK1, *engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1*) fosforiliše Akt na Thr³⁰⁸ i time je delimično aktivira (Andjelkovic i sar., 1999), dok je za potpunu aktivaciju Akt neophodna fosforilacija i na Ser⁴⁷³ od strane kompleksa ciljnog

molekula za rapamicin 2 kod sisara (mTORC2, *engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) (Sarbasov i sar., 2005). Fosforilacija Akt na Ser⁴⁷³ se može odvijati i pod dejstvom PDK2 kinaza, kao i članova familije kinaza povezanih sa PI3K (PIKK, *engl. PI3K-related kinase*), uključujući i DNK zavisne protein kinaze (DNA-PK, *engl. DNA-dependent protein kinase*) (Alessi i Cohen, 1998; Sale i Sale, 2008). Aktivirani Akt fosforiliše nishodne proteine i na taj način reguliše metabolizam nutrijenata, transkripciju gena, rast i proliferaciju ćelija, preživljavanje ćelija i angiogenezu (Lawlor i Alessi, 2001; Ackah i sar., 2005).

Uloga insulina u regulaciji aktivnosti kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2 (ERK1/2, *engl. Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*) signalne kaskade detaljno je izučena (Lee i sar., 1992; Avruch, 1998; Isenovic i sar., 2009). ERK1/2 pripadaju familiji protein kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK, *engl. Mitogen-Activated Protein Kinases*) koje su uključene u regulaciju fundamentalnih ćelijskih procesa, kao što su: diferencijacija i proliferacija, odgovor na stres i preživljavanje (Xiao i sar., 2011; Plotnikov i sar., 2011). Na aktivaciju MAPK signalnog puta utiču mitogeni, ali i drugi vanćelijski stimuli kao što su hormoni, citokini i faktori rasta (Blumer i Johnson, 1994; Cano i Mahadevan, 1995). Osnovu MAPK signalnog puta čine tri kinaze: kinaza kinaze MAPK (MAPKKK, Raf), MAPK kinaza (MAPKK, MEK1/2, MKK) i MAPK (ERK1/2) (Cano i Mahadevan, 1995). Vezivanjem insulina za receptor na plazma membrani inicira se autofosforilacija receptora i sledstvena fosforilacija Tyr ostataka na adaptorskom proteinu Shc, koji dalje stupa u interakciju sa SH2 domenom proteina 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta (Grb2, *engl. Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*) (Lee i sar., 1992) (**Slika 2.**). Grb2 potom preko SH3 domena regrutuje faktor razmene guaninskih nukleotida (SOS, *engl. Guanine Nucleotide Exchange Factors ili Son of Sevenless*), koji aktivira male guanozin-trifosfataze (GTPaze) iz familije Ras (*engl. Rat Sarcoma*) tako što katalizuju zamenu guanozin difosfata (GDP) vezanog za Ras za guanozin trifosfat (GTP) (Rojas i sar., 2011; Pierre i sar., 2011). Aktivirani Ras u kompleksu sa GTP zatim regrutuje Raf iz citosola na plazma membranu, što vodi njegovoj dimerizaciji i aktivaciji (Song i sar., 2002; Bulayeva i sar., 2004). Aktivirani Raf potom fosforiliše Ser/Thr i aktivira MEK, koja zatim fosforiliše Ser/Thr/Tyr i aktivira MAPK (Kyriakis i sar., 1992; Lewis i sar., 1998). Za potpunu aktivaciju ERK1/2 kinaze neophodna je fosforilacija na dvema aminokiselinama: Thr²⁰² i Tyr²⁰⁴ (Cano i Mahadevan, 1995; Yokoyama i sar., 2006). Aktivirana ERK1/2 vodi fosforilaciji Ser i Tyr ostataka i aktivaciji niza supstrata u citoplazmi, kao što su citosolna fosfolipaza A2 (cPLA2, *engl. Cytosolic Phospholipase A2*) (Ulisse i sar., 2000) i ribozomska S6 kinaza (RSK, *engl. Ribosomal S6 Kinase*) (Oh i sar., 2010) ili se ERK1/2 translocira u jedro (Widmann i sar., 1999; Kehat i

Molkentin, 2010), gde svojim delovanjem direktno može da fosforiliše faktore transkripcije kao što su Elk-1, c-Fos, p53, i Ets1/2, koji predstavljaju regulatore rasta i proliferacije (Liang i sar., 2001; Asada i sar., 2007; Kehat i Molkentin, 2010).

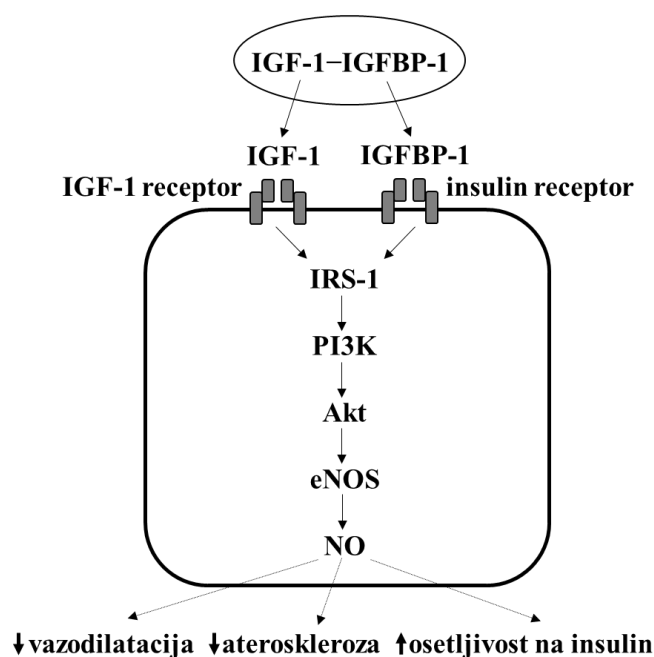


Slika 2. Mehanizmi delovanja insulina u fiziološkim uslovima

IRS-1- supstrat receptora za insulin 1; PI3K- fosfatidilinozitol 3 kinaza; PDK1/2- fosfoinozimid-zavisna protein kinaza 1/2; Akt- protein kinaza B; GLUT4- transporter za glukozu 4; PKC- protein kinaza C; GSK3- kinaza glikogen sintaze 3; mTOR- ciljani molekul za rapamicin 2 kod sisara; RSK- ribozomska S6 kinaza; Shc- protein koji sadrži SH2 domen; Grb2- protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta; SOS- izmenjivač guaninskih nukleotida; Raf- kinaza kinaza protein kinaze aktivirane mitogenima; MAPKK- kinaza protein kinaze aktivirane mitogenima; MAPK- protein kinaza aktivirana mitogenima.

Insulin je, takođe, uključen i u regulaciju aktivnosti proteina koji vezuju IGF (IGFBP, engl. *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*) (Orlowski i sar., 1991). Familiju IGFBP čine 6 homologih proteina koji u cirkulaciji vezuju IGF i sprečavaju njegovo vezivanje za specifični receptor na plazma membrani, regulišući time njegovu dostupnost i funkciju u vaskulaturi (Kelley i sar., 1996). Slobodan IGF-1 u serumu ostvaruje antiinflamatornu i

antiapoptotsku aktivnost, promoviše angiogenezu i smanjuje oksidativni stres u vaskulaturi, dok je njegova aktivnost inhibirana kada se nalazi u kompleksu vezanom sa IGFBP-1 (Bach, 2018). IGFBP-1 se sintetise u jetri, kao i decidualizovanom gestacijskom endometriju, odakle se sekretuje u cirkulaciju gde ostvaruje svoju fiziološku ulogu (Bae i sar., 2013). IGFBP-1 može da ostvaruje svoje efekte nezavisno od IGF-1 i njegovog receptora, najverovatnije tako što se direktno vezuje za receptor za insulin i posredstvom PI3K/Akt signalne kaskade stimuliše aktivnost endotelne azot-monoksid-sintaze (eNOS) i sintezu NO. (Rajwani i sar., 2012) Time IGFBP-1 doprinosi vazodilataciji, regulaciji glikemije i povećanoj osetljivosti na insulin (Slika 3.).



Slika 3. Efekti IGFBP-1 na vaskulturni sistem u fiziološkim uslovima

IGF-1- faktor rasta sličan insulinu 1; IGFBP-1- protein koji vezuje IGF-1; IRS-1- supstrat receptora za insulin 1; PI3K- fosfatidilinozitol 3 kinaza; Akt- protein kinaza B; eNOS- endotelna azot-monoksid-sintaza; NO- azot-monoksid. (preuzeto i modifikovano sa <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/61/4/915>)

Na regulaciju koncentracije IGFBP-1 u cirkulaciji utiču brojni činioci, kao što su inflamatorni citokini, hormoni, nutijenti itd. (Orlowski i sar., 1991). Među regulatorima insulin zauzima posebno mesto, jer svojim delovanjem brzo inhibira transkripciju gena za IGFBP-1 u jetri, smanjuje njegovu koncentraciju u krvi i povećava dostupnost IGF-1 u cirkulaciji (Orlowski i sar., 1991).

1.2.2. Molekulski mehanizmi delovanja insulina u patofiziološkim uslovima

Patofiziološku osnovu za nastanak i razvoj IDDM predstavlja oštećenje i/ili uništenje β -ćelija pankreasa, koje uzrokuje poremećaj u sekreciji ili biološkom dejstvu insulina, usled čega dolazi do stanja hiperglikemije (Rahman i sar., 2007). Stanje hiperglikemije vremenom može da dovede do poremećaja u strukturi (aterosklerotske promene na malim arterijama i arteriolama, kao i smanjenje broja arteriola) i funkciji krvnih sudova (poremećaj u regulaciji cirkulacije, povećana propustljivost krvnih sudova itd.), a sledstveno i oštećenja organa koje ti krvni sudovi prokrvljuju (Stehouwer, 2018). Rezultati brojnih istraživanja su ukazali na postojanje veze između hiperglikemije, inflamacije, oksidativnog stresa i IR (Dresner i sar., 1999; Tirosh i sar., 2001; Rains i Jain, 2011). Hiperglikemija, visoka koncentracija AGE i SMK mogu da doprinesu nastanku oksidativnog stresa bilo direktnim stvaranjem ROS ili promenom redoks ravnoteže (Bloch-Damti i Bashan, 2005). Prekomerna sinteza ROS dovodi do povećane fosforilacije Ser i Thr ostataka receptora za insulin i IRS (Evans i sar., 2003), čime se narušava signalna kaskada insulina i razvija periferna IR (Maechler i sar., 1999; Gardner i sar., 2003; Dokken i sar., 2008), za koju je epidemiološkim studijama pokazano da je povezana sa patogeneozom IDDM (Andersen i sar., 1983; Orchard i sar., 2002). Faktori rizika za nastanak IR kao što su ROS, SMK i inflamatorni citokini mogu da dovedu do povećane fosforilacije IRS-1 na aminokiselinu Ser čime se smanjuje mogućnost fosforilacije na Tyr ostacima i na taj način se sprečava asocijacija IRS-1 sa receptorom za insulin, kao i asocijacija IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K i time inhibira delovanje insulina (Paz i sar., 1997; Tirosh i sar., 1999; Dresner i sar., 1999). Rezultati Varma i saradnika su pokazali da hiperglikemija dovodi do značajnog smanjenja ekspresije PI3K-p85 i fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ uz potpuni izostanak fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ u endotelnim ćelijama, što dovodi do poremećaja u proliferaciji endotelnih ćelija u stanju DM (Varma i sar., 2005). Osim toga, inhibicija ekspresije PI3K-p110 α i Akt u adipocitima blokira insulinom posredovano preuzimanje glukoze (Falasca i sar., 2007; Ng i sar., 2008), što vodi brojnim patofiziološkim procesima, kao i razvoju vaskularnih komplikacija kod obolelih od DM (So i Fruman, 2012).

Poznato je da akutna hiperglikemija može imati dugoročno negativne efekte na obolele od DM tako što stimuliše fosforilaciju ERK1/2 u mononuklearnim ćelijama i to posredstvom aktivacije PKC/Raf/MEK/ERK1/2 puta, što ukazuje na mogući mehanizam kojim glukoza izaziva toksične efekte u patološkim stanjima (Ceolotto i sar., 2001). Takođe, u stanju DM dolazi do aktivacije MAPK u endotelnim ćelijama glomerularnih kapilara, što može da dovede do hipertrofije glomerula i razvoja dijabetične nefropatije (Awazu i sar.,

1999; Kang i sar., 1999). Aktivirana ERK1/2 može da fosforiliše Ser i Thr aminokiselinske ostatke na različitim proteinima uključujući i transkripcione faktore, kao što je NF κ B i na taj način inicira transkripciju gena uključenih u inflamatorni odgovor i proces ateroskleroze (De Fea i Roth, 1997; Basta i sar., 2004; Wortzel i Seger, 2011). Literaturni podaci su pokazali da je primenom specifičnih inhibitora MAPK došlo do snižavanja glikemije, inhibicije IR i inflamacije, što ukazuje na to da regulacija MAPK puta može imati terapijski potencijal u lečenju DM i vaskularnih komplikacija (Awazu i sar., 1999; Tomlinson, 1999; Ueyama i sar., 2016; Kei-ichi i sar., 2016).

U stanju IDDM, usled neadekvatne kontrole glikemije, dolazi do smanjenja koncentracije IGF i povećanja koncentracije IGFBP-1 u serumu koji u fosforilisanom stanju ima veliki afinitet za vezivanje IGF-1, čime dodatno onemogućava njegovo delovanje (Janssen i Lamberts, 2000; van Dijk i sar., 2014). Promena u koncentraciji IGF-1 i IGFBP-1 u serumu dijabetičara postaje izraženija sa starenjem, usled čega se smanjuje protektivno dejstvo IGF-1 na vaskulaturu (Janssen i Lamberts, 2000). Nizak nivo IGF-1 u cirkulaciji može dovesti do disfunkcije endotela, kao i razvoja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija kod obolelih od DM (Blakytyn i sar., 2000; Higashi i sar., 2014; Sharma i sar., 2016). U stanju inflamacije, ROS i citokini, kao što su interleukin 1 beta (IL-1 β , *engl. Interleukin 1 beta*), IL-6 i faktor nekroze tumora alfa (TNF α , *engl. Tumor Necrosis Factor alpha*) mogu stimulisati sekreciju IGFBP-1 u jetri, što može uticati na smanjenje aktivnosti IGF-1 i posledičnog razvoja ateroskleroze (Lang i sar., 1999; Frost i sar., 2000; Lelbach i sar., 2001).

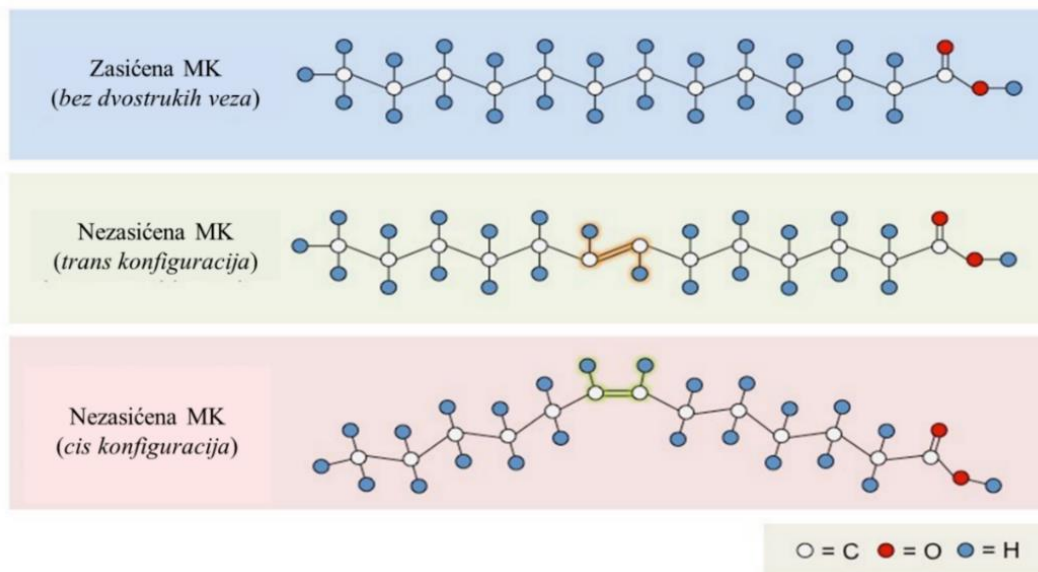
1.3. Masne kiseline (MK)- opšte osobine, struktura i funkcija

Masne kiseline su osnovne gradivne komponente fosfolipida ćelijskih membrana i imaju važnu ulogu u regulaciji transporta kroz membranu, aktivnosti receptora na membrani, prenosa signala i učestvuju u transkripciji određenih gena (Costabile i sar., 2005). Takođe, MK služe kao izvor energije i sastavni su elementi lipoproteina krvi i prekursori jedinjenja sa hormonskim dejstvom, kao što su eikozanoidi (Stanley-Samuels, 1987). MK su sastavljene od linearnog ugljovodoničnog lanca sa metil grupom (CH₃) na ω kraju i karboksilnom grupom (COOH) na α kraju molekula. U prirodnim uljima i mastima preovladavaju MK nerazgranatog lanca sa parnim brojem ugljenikovih atoma i jednom karboksilnom grupom (Tvrzicka i sar., 2011).

1.3.1. Podela i nomenklatura MK

Podela MK vrši se na osnovu: 1) dužine masnokiselinskog lanca, tj. broja ugljenikovih atoma od kojih je masnokiselinski lanac izgrađen, 2) stepena nezasićenosti, tj. odsustva ili prisustva dvostrukih veza u masnokiselinskom lancu i 3) položaja dvostrukih veza u masnokiselinskom lancu. Osobine MK zavise od dužine ugljenikovog lanca, broja dvostrukih veza, kao i njihove konformacije (Tvrzicka i sar., 2011). MK se u organizmu i namirnicama mogu naći u obliku: SMK i estarski vezanih MK u vidu monoglicerida, diglicerida, Tg, holesterol estara, fosfolipida, glikolipida ili lipoproteina (Tvrzicka i sar., 2011).

MK se na osnovu broja atoma ugljenika dele na: MK kratkog lanca (4-8 ugljenikovih atoma), srednjeg lanca (od 8 do 14 ugljenikovih atoma), dugog lanca (≥ 16 ugljenikovih atoma) i veoma dugog lanca (≥ 22 ugljenikovih atoma). U zavisnosti od prisustva ili odsustva dvostrukih veza, MK se mogu podeliti na: zasićene MK, koje nemaju dvostrukih veza (SFA, *engl. Saturated Fatty Acids*), već ugljenikovi atomi grade veze samo sa vodonikom; i nezasićene MK, koje mogu imati jednu dvostruku vezu između atoma ugljenika (MUFA, *engl. Monounsaturated Fatty Acids*) ili više dvostrukih veza (PUFA, *engl. Polyunsaturated Fatty Acid*) (Agostoni i Bruzzese, 1992). Na osnovu prostorne orijentacije dela masnokiselinskog lanca oko dvostruke veze, MK se dele na *cis* i *trans* stereoizomere (**Slika 4.**). Dvostruke veze nezasićenih MK se najčešće javljaju u *cis* konformaciji (Tvrzicka i sar., 2011). Naziv najvećeg broja MK često potiče od vrste masti u kojoj preovladava ta MK (npr. linolna kiselina). Svaka MK ima i svoje sistematsko "ime" prema IUPAC (*engl. International Union of Pure and Applied Chemistry*) nomenklaturi, dobijeno na osnovu broja atoma ugljenika, kao i broja i položaja dvostrukih veza u molekulu (računajući od CH₃ kraja), koji se u nomenklaturi obeležava brojevima ili grčkim slovom- omega (npr. *cis,cis-9,12-oktadekadienska kiselina*) (American Chemical Society, 1960).



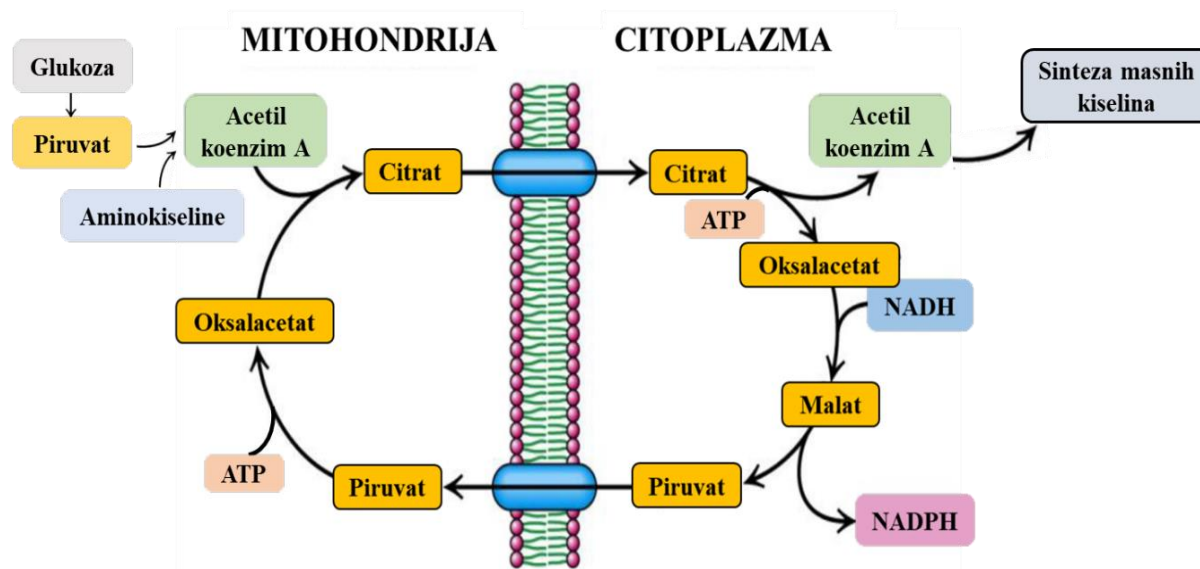
Slika 4. Prikaz strukturne formule zasićenih i nezasićenih MK

(preuzeto i modificirano sa <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/23-carbohydrates-and-lipids/types-of-fatty-acids.html>)

1.3.2. Biosinteza MK

Biosinteza MK (tj. lipogeneza) odigrava se u jetri, adipoznom tkivu i mlečnim žlezdama čoveka i životinja (Donaldson, 1979). Proces sinteze MK strogo je kontrolisan endokrinim signalima, kao i količinom i tipom ishrane (Nguyen i sar., 2008). Pokazano je da dostupnost insulina i citrata aktivira multienzimski kompleks sintaza MK (FAS, *engl. Fatty Acid Synthase*), dok ga glukagon i kateholamini inhibiraju (Muller-Wieland i sar., 1994; Wong i Sul, 2010). Regulacija FAS je u velikoj meri određena unutarćelijskom koncentracijom MK, čije povećanje dovodi do smanjenja aktivnosti FAS. Supstrati neophodni za FAS aktivnost su: acetil koenzim A, malonil koenzim A i NADPH (Donaldson, 1979). Prekursor za biosintezu MK u svim živim sistemima je acetil koenzim A čijom karboksilacijom nastaje malonil koenzim A, dok NADPH služi kao donor elektrona u procesu sinteze MK (Berg i sar., 2002). Acetil koenzim A nastaje primarno razgradnjom aminokiselina, oksidativnom dekarboksilacijom piruvata i β -oksidacijom MK u mitohondrijama. Za biosintezu MK neophodno je da se sav nastali acetil koenzim A u mitohondrijama transportuje u citoplazmu (**Slika 5.**). Acetil koenzim A ne može da prođe kroz mitohondrijsku membranu pasivnim transportom i zato je neophodno da reaguje sa oksalacetatom, pri čemu nastaje citrat. Citrat prolazi u citoplazmu preko transportera za citrat

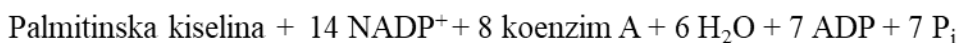
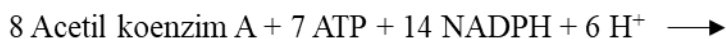
na membrani mitohondrija, gde se ponovo prevodi u acetil koenzim A. Iz nastalog oksalacetata sintetiše se malonil-CoA pomoću enzima acetil koenzim A karboksilaze (Berg i sar., 2002).



Slika 5. Biosinteza MK u citoplazmi

ATP- adenzin-trifosfat; NADH- redukovani nikotinamid adenin dinukleotid; NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat. (preuzeto i modifikovano sa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22554/>)

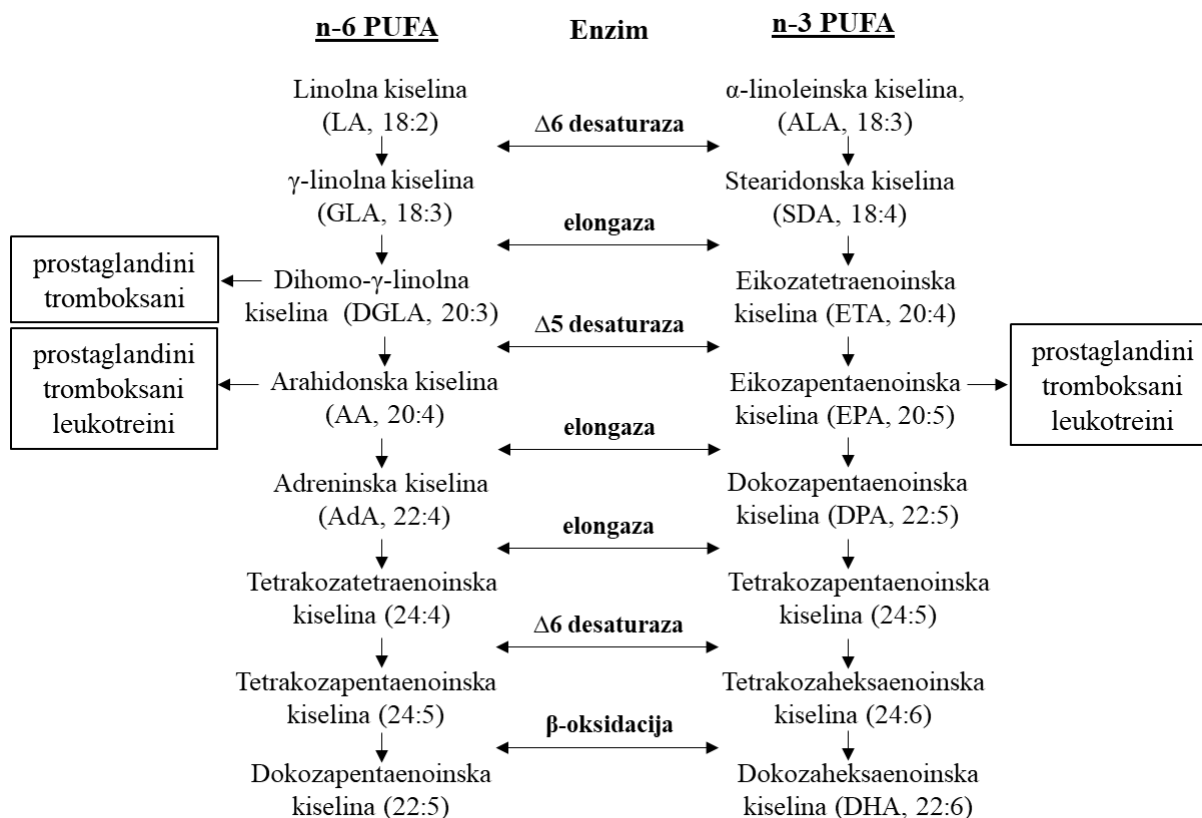
Sinteza malonil koenzima A je odlučujući korak u biosintezi MK, jer se uz pomoć FAS u ponavljajućem nizu reakcija kondenzacija, redukcija, dehidratacija i redukcija u prisustvu NADPH izdužuje masnokiselinski lanac sve dok se ne sintetiše krajnji proizvod, SFA -palmitinska kiselina (PA, 16:0) (Donaldson, 1979; Berg i sar., 2002), na sledeći način:



Polazeći od PA sintetišu se dugolančane i nezasićene MK, MUFA i PUFA. Enzim elongaza MK zadužen za izduživanje ugljovodoničnog lanca MK uz dodavanje dva ugljenikova atoma, deluje na citoplazmatskoj strani endoplazmatičnog retikuluma i mitohondrijima sisara (Donaldson, 1979). Elongaze učestvuju zajedno sa enzimima

desaturazama u procesu sinteze MK i održavanju optimalnog sastava MK u membranama (Guillou i sar., 2010). Desaturaze MK su zadužene za uklanjanje dva atoma H^+ stvarajući dvostruku vezu između tačno određenih ugljenikovih atoma u masnokiselinskom lancu, pri čemu se sintetišu MUFA i PUFA. Kod sisara su prisutne dve različite grupe acil koenzim A desaturaza, koje se razlikuju po poziciji gde uvode dvostruku vezu u odnosu na karboksilni kraj masnokiselinskog lanaca ($\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$) (Nakamura i Nara, 2003). Stearoil-koenzim A desaturaza (SCD) ili $\Delta 9$ desaturaza ima nekoliko izoformi i zadužena je za prevođenje SFA u MUFA (Paton i Ntambi, 2009). Desaturaze $\Delta 6$ i $\Delta 5$ su ključni enzimi za sintezu PUFA. Desaturaze $\Delta 5$ i $\Delta 6$ kao početni supstrat koriste esencijalne n-3 i n-6 PUFA, koje ljudski organizam ne može sintetisati: linolnu (18:2, n-6 PUFA) i α -linoleinsku kiselinu (18:3, n-3 PUFA), pa zajedno sa elongazama učestvuju u sintezi dugolančanih PUFA (**Slika 6.**) (Das, 2006).

Pokazano je da je povećana ekspresija $\Delta 9$ desaturaze povezana sa razvojem DM, gojaznošću i metaboličkim sindromom (Jones i sar., 1996; Wang i sar., 2006). Aktivacija $\Delta 9$ desaturaze povećava ekspresiju gena uključenih u sintezu MK, dok inhibicija $\Delta 9$ desaturaze povećava ekspresiju gena uključenih u β -oksidaciju MK, što dovodi do smanjenja akumulacije lipida u jetri i koncentracije Tg, kao i povećanja osetljivosti na insulin (Dobrzyn i Ntambi, 2004; MacDonald i sar., 2008). Povećana aktivnost desaturaza $\Delta 5$ i $\Delta 6$ vodi povećanju nivoa arahidonske kiseline (20:4, n-6 PUFA) poznate po svojim inflamatornim svojstvima i smanjenju nivoa eikozapentaenske kiseline (20:5, n-3 PUFA), koja ispoljava antiinflamatorna svojstva, što se dovodi u vezu sa visokom koncentracijom markera inflamacije, kao što je CRP i povećanim rizikom za razvoj aterosklerotskih vaskularnih komplikacija (Martinelli i sar., 2008).



Slika 6. Sinteza n-6 i n-3 PUFA

1.3.3. Uloga MK u razvoju DM

Promene u nivou i sastavu MK u plazmi mogu imati kliničke implikacije za razvoj metaboličkih poremećaja, kao što je DM (Naidina i sar., 2009). Visoka koncentracija SMK u plazmi povezana je sa neadekvatnom kontrolom glikemije, a interakcija između MK i glukoze u stanju hiperglikemije može dovesti do oksidativnog stresa, inflamacije, ateroskleroze, i povećati rizik za nastanak vaskularnih komplikacija u DM (Wei i sar., 2016; Wanders i sar., 2016). U stanju poremećenog metabolizma masti, kao što je DM, visoka koncentracija SMK i inflamatornih citokina utiče na povećanje fosforilacije IRS-1 na Ser ostacima, čime se posledično smanjuje insulin-zavisna fosforilacija IRS-1 na Tyr, kao i aktivacija PI3K što rezultira inhibicijom transporta glukoze (Kim i sar., 2001; Yu i sar., 2002). Usled negativnog efekta SMK na IRS-1/PI3K/Akt signalnu kaskadu dolazi do smanjenja insulinom posredovane sinteze NO i posledičnog razvoja disfunkcije endotela (Kim i sar., 2005). SMK, zavisno od koncentracije, mogu aktivirati serin kinazu IκKβ zaduženu za regulaciju aktivnosti NFκB, transkripcionog faktora uključenog u proces

inflamacije (Kim i sar., 2005). Takođe, IKK β direktno fosforiliše IRS-1 na Ser³⁰⁷ i time dodatno narušava signalni put insulina, što ukazuje na potencijalni mehanizam kojim SMK mogu da doprinesu razvoju inflamacije i IR (Gao i sar., 2002). Poznato je da je kod obolelih od DM usled neadekvatnih prehrambenih navika i pratećeg poremećaja u metabolizmu masti povećana koncentracija SFA u plazmi, dok je koncentracija esencijalnih PUFA (posebno dokazaheksaenoinska kiselina) značajno smanjena (De Caterina i sar., 2007; Chuang i sar., 2012). Visoka nivo SFA povećava rizik za nastanak DM (ARIC Study Investigators, 2003), tako što SFA podstiču aktivaciju inflamatorne kaskade i dovede do uništavanja β -ćelija pankreasa (Kennedy i sar., 2009). Takođe, SFA deluju proaterogeno na taj način što povećavaju ukupni holesterol i LDL u serumu i tako utiču na razvoj gojaznosti i povećavaju rizik za nastanak KVB (Briggs i sar., 2017). Visok unos SFA povezan je sa smanjenom osetljivošću na insulin i poremećenom tolerancijom tkiva na glukozu (Koska i sar., 2016).

Nezasićene MK su podložne oksidaciji, a posebno MK sa više dvostukih veza. Usled oksidacije MK dolazi do nastanka ROS koje mogu oštetiti ćelijske membrane, genetski materijal jedra i inaktivirati pojedine enzime, što za posledicu ima razvoj raznih bolesti (Awada i sar., 2012). Sa druge strane, povećan unos MUFA, a posebno oleinska kiselina, povezan je sa smanjenjem koncentracije ukupnog holesterola, LDL i Tg u plazmi, a ima i pozitivan efekat na obolele od koronarne arterijske bolesti i smanjenje rizika za razvoj KVB (Schwingshackl i Hoffmann, 2012). Visok nivo n-3 PUFA u cirkulaciji, takođe, ima pozitivan efekat na metabolizam glukoze i lipida u krvi na taj način što smanjuje glikemiju i lipida doprinoseći usporavanju procesa ateroskleroze (Erkkila i sar., 2004; Erkkila i sar., 2008). Rezultati brojnih studija su pokazali da n-3 PUFA utiču na smanjenje koncentracije lipida u krvi i krvnog pritiska, poboljšavaju funkciju srca i endotela, ostvaruju antitrombocitne efekte i imaju ključnu ulogu u protektivnom dejstvu na kardiovaskularni sistem (KVS) (Rizza i sar., 2009; Shantakumari i sar., 2014; Zanetti i sar., 2015). Nizak nivo n-3 PUFA u fosfolipidima skeletnih mišića povezan je sa smanjenom osetljivošću na insulin, ukazujući na to da promene u sastavu MK u fosfolipidima ćelijskih membrana mogu da utiču na dejstvo insulina (Chang i sar., 2019). U studiji koju su sprovedi Somova i saradnici na pacovima pokazano je da povećan unos n-3 PUFA reguliše metabolizam glukoze povećavajući osetljivost tkiva na insulinu, kao i da smanjuje koncentraciju ukupnog holesterola i LDL u plazmi (Somova i sar., 1999). Osim toga, n-3 PUFA smanjuju uništavanje β -ćelija pankreasa i inhibiraju inflamaciju tako što utiču na smanjenje: sekrecije inflamatornih citokina, proliferacije T-limfocita i transkripcije gena uključenih u inflamatorni odgovor (Krishna Mohan i Das, 2001; Calder i Grimble, 2002). Kod obolelih od DM, posebno je izraženo smanjenje nivoa

dokazaheksaenoinske kiseline, koja je važan gradivni element membrane fotoreceptorskih ćelija retine i ima ključnu ulogu u funkcionisanju centralnog nervnog sistema (Wang i sar., 2003; Pallares i sar., 2012; Shindou i sar., 2017). Nasuprot povoljnim efektima n-3 PUFA, brojne studije su ukazale na inflamatorne efekte n-6 PUFA i njihovu povezanost sa faktorima rizika za nastanak DM (Toborek i sar., 2002; Calder, 2005). Toborek i saradnici su pokazali da LA može da poveća unutarćelijsku koncentraciju jona Ca^{2+} , poveća sintezu ROS (Toborek i sar., 1996) i stimuliše transkripciju gena uključenih u inflamatorni odgovor (Toborek i sar., 2002). Jedna od najzastupljenijih n-6 PUFA u fosfolipidima, arahidonska kiselina, takođe je uključena u inflamatorni proces, tako što utiče na biosintezu inflamatornih eikozanoida (prostaglandini, tromboksani, leukotrijeni itd.) koji čine lipidne medijatore imunskog odgovora, hormonske regulacije, regulacije krvnog pritiska, senzibilizacije neurona na bol, apoptoze itd. (Hallahan i Garland, 2005; Yui i sar., 2015). Prostaglandini poreklom od arahidonske kiseline promovišu oštećenje β -ćelija pankreasa, inhibiraju proliferaciju β -ćelija pankreasa i smanjuju sekreciju insulina, i na taj način doprinose razvoju DM i vaskularnih komplikacija (Luo i Wang, 2011). Osim toga, pokazano je da postoji pozitivna korelacija između povišenog nivoa arahidonske kiseline u fosfolipidima skeletnih mišića i osetljivosti tkiva na insulin, što ukazuje na to da n-6 PUFA u fosfolipidima mišića i poreklom iz hrane imaju sposobnost da regulišu aktivnost insulina (Borkman i sar., 1993). Efekti PUFA na zdravlje ljudi, pre svega, zavise od odnosa nivoa n-3 i n-6 PUFA koji je u savremenim prehrambenim navikama u proseku za 2,5 puta manji u odnosu na preporučene vrednosti, što dovodi do povećane učestalosti mnogih hroničnih bolesti, među kojima je i DM (Castro-Correia i sar., 2017). Snižavanje nivoa n-6 PUFA u odnosu na nivo n-3 PUFA utiče na smanjeno stvaranje inflamatornih eikozanoida iz n-6 PUFA i povećano stvaranje antiinflamatornih medijatora iz n-3 PUFA (Ristic-Medic i sar., 2009). Takođe, smanjenje unosa n-6 PUFA ima isti efekat na zdravlje kao i povećanje unosa n-3 PUFA (Wall i sar., 2010).

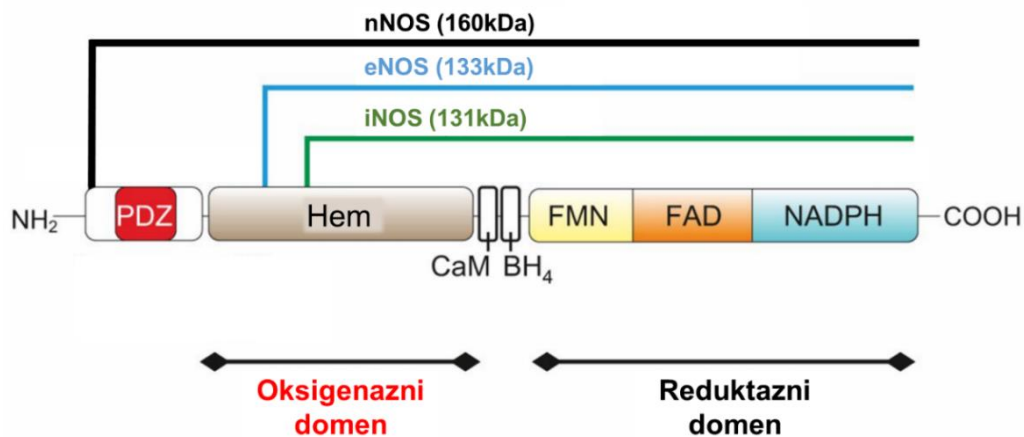
1.4. Azot-monoksid (NO) i azot-monoksid-sintaze (NOS)

Molekul NO je prvi gasni molekul, opisan kao medijator u signalnim putevima, koji je uključen u brojne fiziološke i patofiziološke procese u vaskularnom sistemu (Arthur, 1988). NO, takođe, predstavlja lipofilni slobodni radikal, koji može slobodno da difunduje i ostvaruje svoje efekte reagujući sa mnogobrojnim molekulima i slobodnim radikalima u

vaskulaturi (Okatani i sar., 1998; Mikkelsen i Wardman, 2003). U zavisnosti od koncentracije NO može imati dvostruku funkciju u vaskulaturi, jer u nižim koncentracijama NO ostvaruje ulogu snažnog vazodilatatora, dok u visokoj ostvaruje ulogu citotoksina i citostatika u odbrani organizma od parazitskih mikroorganizama ili tumora (Coggins Matthew i Bloch Kenneth, 2007; Thomas i sar., 2008; Feng, 2012). U fiziološkim ulovima, NO učestvuje u održavanju vaskularnog tonusa i integriteta vaskulature, procesu oksigenacije tkiva, proliferaciji glatkih mišićnih ćelija vaskulature (VSMC, *engl. Vascular Smooth Muscle Cell*), zarastanju rana i angiogenezi (Knowles i Moncada, 1994; Poderoso i sar., 1996), kao i u imunskom odgovoru, omogućavajući učešće u antimikrobnim, antitrombotskim i antioksidativnim aktivnostima (Kuo i sar., 1997; Taylor i sar., 1998; Sass i sar., 2001). Održavanje dostupnosti NO u endotelu neophodno je za normalno funkcionisanje vaskularnog sistema (Jin i Loscalzo, 2010).

Smanjena dostupnost NO, kao posledica smanjene sinteze NO ili usled interakcije NO sa ROS, povećava rizik za disfunkciju endotela i povećava verovatnoću za razvoj HPA, ateroskleroze, DM i vaskularnih komplikacija (Napoli i Ignarro, 2009; Dellamea i sar., 2014; Assmann i sar., 2016). U interakciji NO i ROS stvara se toksični intermedijer, peroksinitrit (ONOO^-) koji je visoko reaktivan i može modifikovati proteine direktnom reakcijom (nitracijom i S-nitrozilacijom) sa cisteinskim (Cys) i Tyr aminokiselinskim ostacima ili hem grupama na proteinima, inhibirajući tako njihovu aktivnost (Cuzzocrea i sar., 2004; El Gawad i sar., 2011).

NO u organizmu sisara nastaje posredstvom enzima NO sintaza (NOS, *engl. NO synthase*). Do sada su izolovane i strukturno-funkcionalno okarakterisane četiri različite izoforme enzima NOS: neuronska (nNOS, *engl. Neuronal NOS*), inducibilna (iNOS, *engl. Inducible NOS*), endotelna NOS (eNOS, *engl. Endothelial NOS*) i još nedovoljno istražena mitohondrijska NOS (mtNOS, *engl. Mitochondrial NOS*) (Arthur, 1988; Ghafourifar i sar., 1999; Parola i Robino, 2001). Izoforme NOS predstavljaju proizvode ekspimiranja različitih gena iste funkcije (NOS 1, 2, 3 na hromozomima 12, 17 i 7) sa različitom regulacijom, lokalizacijom unutar ćelije i osetljivošću na inhibitore (Alderton i sar., 2001). Sve izoforme NOS funkcionišu kao homodimeri, veličine od 131 do 160 kDa i sadrže oksigenazni i reduktazni domen (**Slika 7.**) (Steinert i sar., 2010).

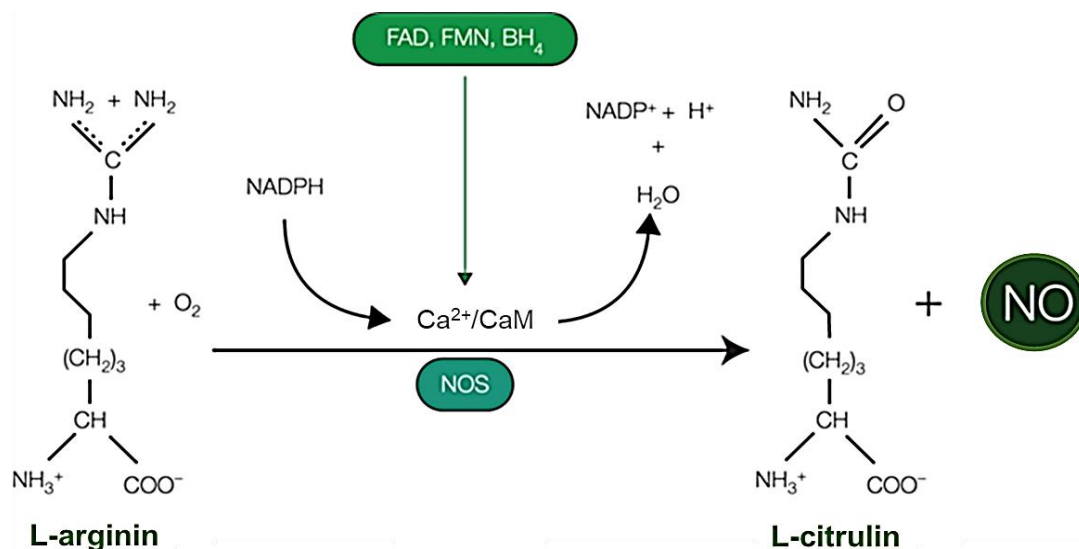


Slika 7. Shematski prikaz građe NOS

nNOS- neuronska NOS; *eNOS*- endotelna NOS; *iNOS*- inducibilna NOS; *NH₂*- amino domen enzima; *PDZ*- domen od oko 200 aminokiselina na *nNOS*; *Hem*- gvožđe protoporfirin IX; *CaM*- kalmodulin; *BH₄*- tetrahydrobiopterin; *FMN*- flavin mononukleotid; *FAD*- flavin adenin dinukleotid; *NADPH*- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; *COOH*- karboksilni domen enzima. (preuzeto i modificovano od Steinert, 2010)

NOS enzimi katalizuju reakciju u kojoj se L-arginin i molekularni O_2 prevode u NO i L-citrulin (**Slika 8.**) (Knowles i Moncada, 1994). Za potpunu aktivaciju NOS neophodna je dimerizacija i udruživanje sa dva molekula kalmodulina (CaM). Takođe, za aktivaciju NOS enzima potrebno je udruživanje sa sledećim kosupstratima: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP) i O_2 , kao i nizom kofaktora: tetrahydrobiopterin (BH_4), flavin mononukleotid/flavin adenin dinukleotid (FMN/FAD) i hem (Baek i sar., 1993). Reakcija nastanka NO katalizovana NOS enzimima odvija se kroz dve reakcije monooksigenacije. U prvoj reakciji se dva elektrona, nastala dehidrogenacijom NADPH na reduktaznom domenu, preko FAD i FMN prenose do hema na oksigenaznom domenu. U drugoj reakciji preneti elektroni redukuju O_2 i oksiduju L-arginin u L-citrulin i NO u prisustvu kofaktora BH_4 , koji doprinosi stabilizaciji aktivne dimerne forme NOS enzima (Baek i sar., 1993). Kod konstitutivno eksprimiranih izoformi NOS, aktivnost enzima je regulisana koncentracijom jona Ca^{2+} unutar ćelije. U visokoj koncentraciji Ca^{2+} se vezuje za CaM, i Ca^{2+}/CaM aktivira NOS preko CaM-vezujućeg domena (Baek i sar., 1993). Nasuprot tome, aktivnost *iNOS* ne zavisi od visoke koncentracije Ca^{2+} unutar ćelije, jer je CaM čvrsto vezan za *iNOS* i pri niskim koncentracijama jona Ca^{2+} , najverovatnije zato što kod ove izoforme NOS, CaM-vezujući domen ima drugačiju aminokiselinsku strukturu, te se CaM vezuje za oba domena

enzima (Lee i Stull, 1998). Sve aktivirane izoforme NOS mogu biti eksprimirane u KVS, gde ostvaruju različite biološke efekte (Chen i sar., 2008). Pokazano je da usled smanjene dostupnosti supstrata, kosupstrata ili kofaktora dolazi do funkcionalne razgradnje NOS dimera, usled čega nastaju monomeri NOS, što rezultuje produkcijom superoksid anjona (O_2^-) i $ONOO^-$ radikala (Knowles i Moncada, 1994).



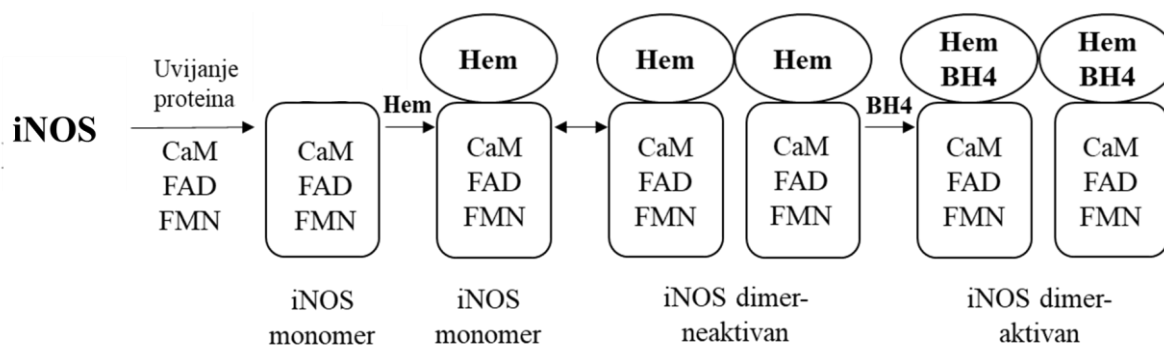
Slika 8. Mehanizam sinteze NO posredstvom NOS enzima

Na slici je prikazan mehanizam kojim azot-monoksid-sintaza (NOS) sintetiše azot-monoksid (NO) i L-citrulin iz L-arginina i molekuskog kiseonika (O_2). NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; Ca^{+2}/CaM - kalcijum/kalmodulin; FAD- flavin adenin dinukleotid; FMN- flavin mononukleotid; BH_4 - tetraidrobiopterin. (preuzeto i modifikovano sa <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/neuro.01.024.2009/full>)

1.4.1. Inducibilna azot-monoksid-sintaza (iNOS) - građa i funkcija

Inducibilna izoforma NOS je jedan od članova NOS familije čija je aktivnost regulisana na nivou transkripcije i *de novo* sinteze enzima, nezavisno od unutarćelijske koncentracije jona Ca^{2+} i molekula CaM (Jones i sar., 2007). Gen za iNOS nalazi se na hromozomu 17, sastoji se od 26 egzona i 25 introna i dužine je oko 37 kbp (Chartrain i sar., 1994). iNOS je prvobitno identifikovan u makrofagima (Nathan i Hibbs, 1991), ali se takođe eksprimira i u tkivima KVS i organima osetljivim na dejstvo insulina kao što su jetra, adipozno tkivo i skeletni mišići (Fujimoto i sar., 2005). Za razliku od ostalih izoformi NOS

koje se eksprimiraju konstitutivno, iNOS se eksprimira u odgovoru na parazitske mikroorganizme, inflamatorne citokine, faktore rasta, visoku koncentraciju MK, hiperglikemiju itd. (Szabo i sar., 1994; Geller i sar., 1995; Shimabukuro i sar., 1997). Poznato je da je za aktivaciju i stabilizaciju homodimerne forme iNOS, kao i ostalih članova NOS familije, neophodno prisustvo L-arginina i kofaktora BH4 (**Slika 9.**) (Aktan, 2004).



Slika 9. Shema stvaranja aktivne dimerne forme iNOS proteina

Nakon sinteze iNOS proteina, formira se reduktazni domen iNOS monomera u prisustvu kalmomodulina (CaM), flavin adenin dinukleotida (FAD) i flavin mononukleotida (FMN). Prenos gvožđa protoporfirina IX (Hem) na oksigenazni domen podstiče dimerizaciju proteina, a prisustvo tetrahidrobiopterina (BH4) i arginina doprinosi stabilizaciji aktivne dimerne forme iNOS. Preuzeto i modifikovano iz (Aktan, 2004).

U odsustvu supstrata ili kofaktora, iNOS ostaje neaktivan u formi monomera, usled čega dolazi do stvaranja O_2^- na reduktaznom domenu iNOS, što dovodi do oksidativnog stresa (Xia i sar., 1998; Zhang i sar., 2007). Jednom eksprimiran iNOS ostaje konstantno aktivan do degradacije enzima i sintetisuje velike količine NO (od 10nM do 1000 μ M), usled čega može doći do nastanka reaktivnih vrsta azota (RNS, *engl. Reactive Nitric Species*) i nitrozativnog stresa (Nathan i Hibbs, 1991). Ovako nastali NO ima važnu ulogu kako u citoprotekciji tako i u citotoksičnosti, zavisno od njegove koncentracije u ćeliji (Thomas i sar., 2008). Koncentracija NO u okviru referentnih vrednosti doprinosi preživljavanju i proliferaciji ćelija, dok visoka koncentracija NO dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, apoptoze i starenja ćelija (Thomas i sar., 2008). Do apoptoze endotelnih ćelija dolazi usled oksidacije, nitrozacije i nitracije niza enzima i receptora proteina uključenih u proces apoptoze ćelija posredstvom ROS i RNS, nastalih aktivnošću iNOS (Kim i sar., 1999; Kotamraju i sar., 2003). iNOS je jedan od ključnih medijatora inflamacije i ima važnu ulogu

u pravilnom funkcionisanju imunskog sistema sisara (Bogdan i sar., 2000). U stanju akutne inflamacije, NO u makrofagima poreklom od iNOS ostvaruje ulogu u odbrani organizma od patogenih mikroorganizama tako što se vezuje za gvožđe u katalitičkim domenima niza enzima, kao što su enzimi uključeni u lanac transporta elektrona u mitohondrijama, reduktaze ribonukleotida i enzime uključene u ciklus limunske kiseline i na taj način inhibira njihovu aktivnost i ostvaruje citotoksične i citostatske efekte (Nathan i Hibbs, 1991). U krvnim sudovima iNOS ostvaruje ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa i održavanju integriteta vaskulature, tako što smanjuje: vaskularnu permeabilnost, agregaciju trombocita, adheziju leukocita za endotel i proliferaciju VSMC (Papapetropoulos i sar., 1999; Shah, 2000). Pokazano je da u stanju ishemije, iNOS zajedno sa faktorom rasta vaskularnog endotela (VEGF, engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) posreduje u procesu angiogeneze (Kroll i Waltenberger, 1998; Ostendorf i sar., 2004; Nematollahi i sar., 2009). Dayal i saradnici su istakli da je u fiziološkim i/ili blago patološkim stanjima iNOS slabo eksprimiran u VSMC, stoga ostvaruje protektivnu ulogu, odnosno smanjuje oksidativni stres i vaskularne komplikacije (Dayal i sar., 2014). Nasuprot tome, povećana ekspresija iNOS može da ošteti važne molekule u ćeliji, kao što su DNK, proteini i lipidi, i na taj način dovede do razvoja inflamatornih, neurodegenerativnih i autoimunskih bolesti, kao i brojnih vaskularnih komplikacija (Kroncke i sar., 1991; Saluja i sar., 2011).

1.4.2. Molekulski mehanizmi regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS

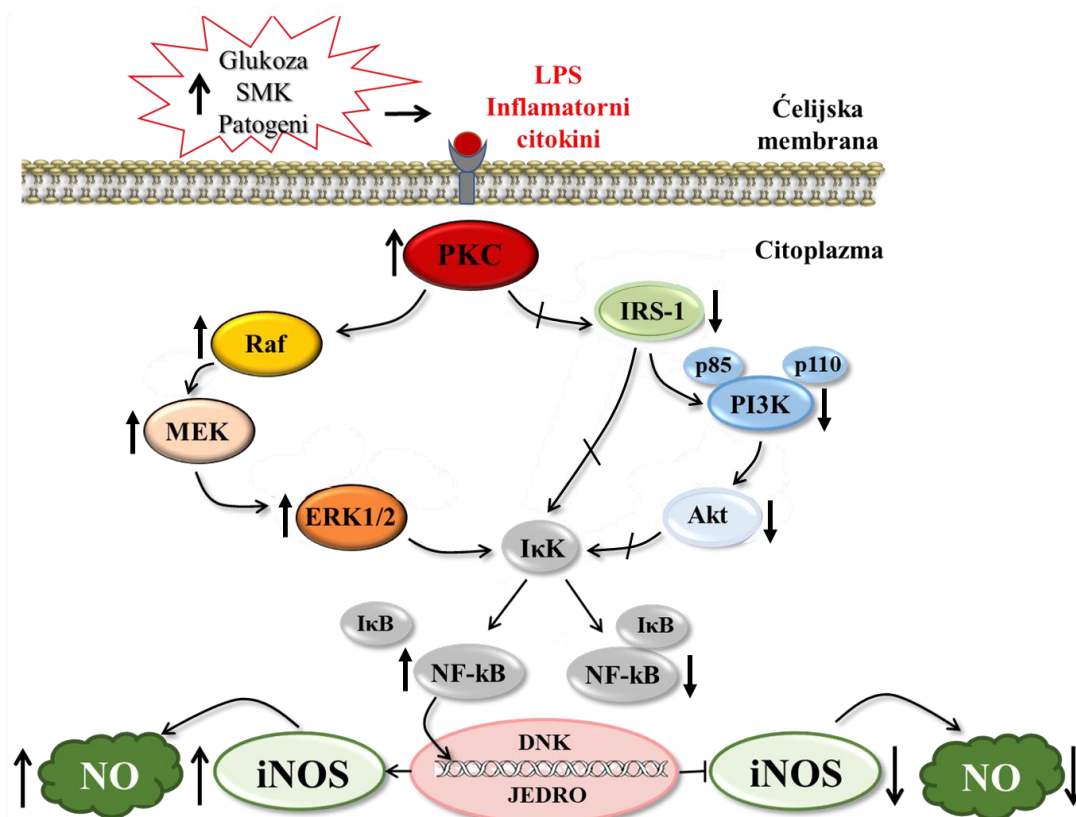
Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS posredovana je brojnim hormonima, inflamatornim citokinima, transkripcionim faktorima, kinazama, AGE i ROS (Xie i sar., 1994; Eizirik i sar., 1996; Sun i sar., 2010; Zhang i sar., 2017). Ekspresija gena za iNOS regulisana je, pre svega, na nivou transkripcije, a zatim na nivou *de novo* sinteze enzima. Brojni činioci, kao što su: citokini, lipopolisaharidi (LPS), AGE i ROS, mogu dovesti do aktivacije transkripcionih faktora su uključenih u transkripciju gena za iNOS, među kojima je i NFκB (Xie i sar., 1994; Zhang i sar., 2017). Signalni putevi koji su uključeni u aktivaciju transkripcionih faktora variraju u zavisnosti od tipa ćelija (Murdolo i Smith, 2006; Musunuru, 2010).

Familiju NFκB čine pet članova: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NFκB1 (p50 i njegov prekursor p105) i NFκB2 (p52 i njegov prekursor p100). Kako bi se vezali za DNK i promenili ekspresiju gena, članovi NFκB familije formiraju homodimere ili heterodimere

(Xiao, 2004). NF κ B je najčešće prisutan u formi heterodimera p65/p50 i ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena uključenih u odgovoru organizma na inflamaciju (Pahl, 1999; Xiao, 2004). Kada je u neaktivnom stanju NF κ B nalazi se u citosolu, vezan za inhibitorski protein (I κ B, *engl. Inhibitor of NF κ B*) (Myers, 2004). Za aktivaciju NF κ B neophodno je da dođe do razgradnje I κ B-NF κ B kompleksa, tj. do fosforilacije I κ B, koju vrši I κ B kinaza (I κ K, *engl. I κ B Kinase*). Akt ili ERK1/2 kinaze mogu da fosforilišu I κ K koja se na taj način aktivira i potom fosforiliše I κ B, nakon čega dolazi do disocijacije I κ B-NF κ B kompleksa. Slobodni NF κ B se zatim translocira u jedro gde inicira transkripciju čitavog spektra gena odgovornih za sintezu molekula koji posreduju u razvoju inflamacije, uključujući citokine, adhezione molekule, iNOS i dr. (Hattori i sar., 2003; Hou i sar., 2009). Hofmann i saradnici su pokazali da hiperglikemija može aktivirati NF κ B *ex vivo* u izolovanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod obolelih od IDDM (Hofmann i sar., 1998). Autori su ukazali da je za aktivaciju NF κ B delimično odgovoran oksidativni stres, jer nakon tretiranja mononuklearnih ćelija α -lipoinskom kiselinom koja ima antioksidativna svojstva, dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti NF κ B. Do aktivacije NF κ B i sledstvene ekspresije gena za iNOS, dolazi i usled visoke koncentracije SMK u plazmi (Barma i sar., 2009), kao i stanja hipoksije (Koong i sar., 1994; Rius i sar., 2008) itd.

U molekulske mehanizme regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS uključene su i različite kinaze, kao što su: IRS-1, PI3K, Akt i ERK1/2 (Kim i Kim, 2005; Dan i sar., 2008; Sudar Milovanovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2019) (**Slika 10.**). U stanju DM i IR dolazi do aktivacije PKC koja inhibira aktivnost IRS-1 i PI3K, što dovodi do nishodne inhibicije Akt kinaze koja reguliše aktivnost NF κ B, a time i ekspresiju iNOS (Benoit i sar., 2009; Maeno i sar., 2012). Inhibicijom PI3K/Akt signalnog puta izostaje fosforilacija I κ K posredovana Akt kinazom što sprečava aktivaciju NF κ B i sledstvenu transkripciju gena za iNOS (Hattori i sar., 2003; Zhang i sar., 2011). Osim toga, sve je veći broj studija koje ukazuju na važnu ulogu ERK1/2 u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS (Zhao i Lee, 1999; Slomiany i Slomiany, 2002; Xu i sar., 2006; Panic i Stanimirovic, 2018). Aktivacija ERK1/2 signalnog puta neophodna je za IL-1 β -indukovanu ekspresiju iNOS i sintezu NO u β -ćelijama pacova (Larsen i sar., 1998), što ukazuje na potencijalni mehanizam kojim ERK1/2 posreduje u apoptozi β -ćelija pankreasa i razvoju IDDM (Pavlovic i sar., 2000). Pokazano je da aktivacija ERK1/2 signalnog puta posredovana aktivacijom PKC vodi fosforilaciji I κ K i aktivaciji NF κ B, koji u jedru inicira transkripciju gena za iNOS (Zhao i Lee, 1999; Wen i sar., 2011). Mohammad i saradnici su ukazali na ključnu ulogu ERK1/2 signalnog puta u razvoju dijabetične retinopatije primenom inhibitora za ERK1/2 koji dovodi do smanjene

ekspresije iNOS, IL-6, TNF- α i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9, *engl. Matrix Metalloproteinase 9*) u retini pacova sa DM (Mohammad i sar., 2013).



Slika 10. Mehanizmi regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS u stanju DM i inflamacije

SMK- slobodne masne kiseline; LPS- lipopolisaharidi; IRS-1- supstrat receptora za insulin 1; PI3K- fosfatidilinozitol 3 kinaza; Akt- protein kinaza B; PKC- protein kinaza C; Raf i MEK- kinaze kinaze protein kinaza aktiviranih mitogenima; ERK1/2- kinaza regulisana vanćelijskim signalima 1 i 2; NF κ B- nuklearni faktor κ B; I κ B- inhibitorni protein NF κ B; I κ K- kinaza inhibitora κ B; iNOS- inducibilna azot-monoksid-sintaza; NO- azot-monoksid; \uparrow - povećana aktivnost; \downarrow - smanjena aktivnost.

1.4.3. Uloga iNOS u razvoju DM i vaskularnih komplikacija

Smatra se da je iNOS je jedan od ključnih medijatora inflamacije i metaboličkih poremećaja, kao što je DM (Williams i sar., 1996; Assmann i sar., 2016). U stanju DM dolazi do povećane ekspresije gena za iNOS i aktivacije ovog enzima, koji kontinuirano sintetizuje do 1000 puta više NO nego konstitutivne forme NOS (Yang i sar., 2010; Di Pietro i sar., 2013;

Adela i sar., 2015). U mononuklearnim ćelijama, izolovanim iz Langerhansovih ostrvaca pankreasa miševa sa DMT1, uočeno je povećanje ekspresije iNOS izazvano povećanim nivoom inflamatornih citokina, kao što su IL-1 i interferon gamma (IFN γ) u poređenju sa vrednostima istih parametara kod zdravih miševa (Rabinovitch i sar., 1996; Kato i sar., 2003). Pokazano je da je NO, poreklom od iNOS, medijator apoptoze β -ćelija u IDDM, kako kod životinja, tako i kod ljudi (Eizirik i sar., 1994). U prilog tome ide i uočeno povećanje ekspresije iNOS u β -ćelijama pankreasa miševa sa DM (Muhammed i sar., 2012), kao i to da su „*knockout*“ miševi sa delecijom gena za iNOS otporni na DM izazvan streptozotocinom (Rabinovitch i sar., 1996). Povećana ekspresija iNOS u jetri miševa može inhibirati dejstvo insulina, jer dovodi do nitracije insulina kao i molekula uključenih u molekularni mehanizam delovanja insulina (Carvalho-Filho i sar., 2005; Charbonneau i Marette, 2010). Usled nitracije insulina dolazi do narušavanja njegovih fizičko-hemijskih osobina, sposobnosti vezivanja za receptor insulina, kao i njegove funkcije u metabolizmu glukoze (Chi i Huang, 2007; House i sar., 2015). Akutno izlaganje primarne kulture β -ćelija visokim koncentracijama RNS dovodi do oštećenja DNK i apoptoze β -ćelija (Delaney i sar., 1996; Eizirik i sar., 1996). Pokazano je da primena inhibitora iNOS sprečava razvoj DM u različitim animanim modelima (Corbett i sar., 1993; Shimabukuro i sar., 1997), dok inhibicija iNOS u Langerhansovim ostrvcima pacijenata sa DMT2 dovodi do povećane vitalnosti β -ćelija i sekrecije insulina (Muhammed i sar., 2012). Sve navedeno ukazuje na terapijski potencijal iNOS enzima u prevenciji i lečenju DM i vaskularnih komplikacija.

Razvoj mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija kod obolelih od DM dovodi se u vezu sa povećanom ekspresijom i aktivnošću iNOS (Fujimoto i sar., 2005; Nagareddy i sar., 2009; Yang i sar., 2010). Pokazano je da je citokinima izazvana aktivacija iNOS u makrofagima, limfocitima i VSMC povezana sa procesom ateroskleroze kod životinja i čoveka (Buttery i sar., 1996; Behr-Roussel i sar., 2000; Kuhlencordt Peter i sar., 2001) i da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između ekspresije iNOS i veličine aterosklerotskih lezija (Alfon i sar., 1999). iNOS preferencijalno promoviše formiranje ONOO $^-$ u procesu ateroskleroze što doprinosi lipidnoj peroksidaciji i oštećenju vaskulature (Buttery i sar., 1996). Osim toga, iNOS može biti aktivni učesnik u procesu ruptуре aterosklerotskog plaka kod karotidnih arterija ljudi (Behr-Roussel i sar., 2000). Leal i saradnici su ukazali na postojanje direktne veze između NO sintetisanog iz iNOS i rane faze nastanka dijabetične retinopatije (Saluja i sar., 2011). Takođe je pokazano da hronična hiperglikemija dovodi do vaskularne i glomerulne disfunkcije, posredstvom mehanizma koji uključuje povećanu sintezu NO u serumu (Chiarelli i sar., 2000).

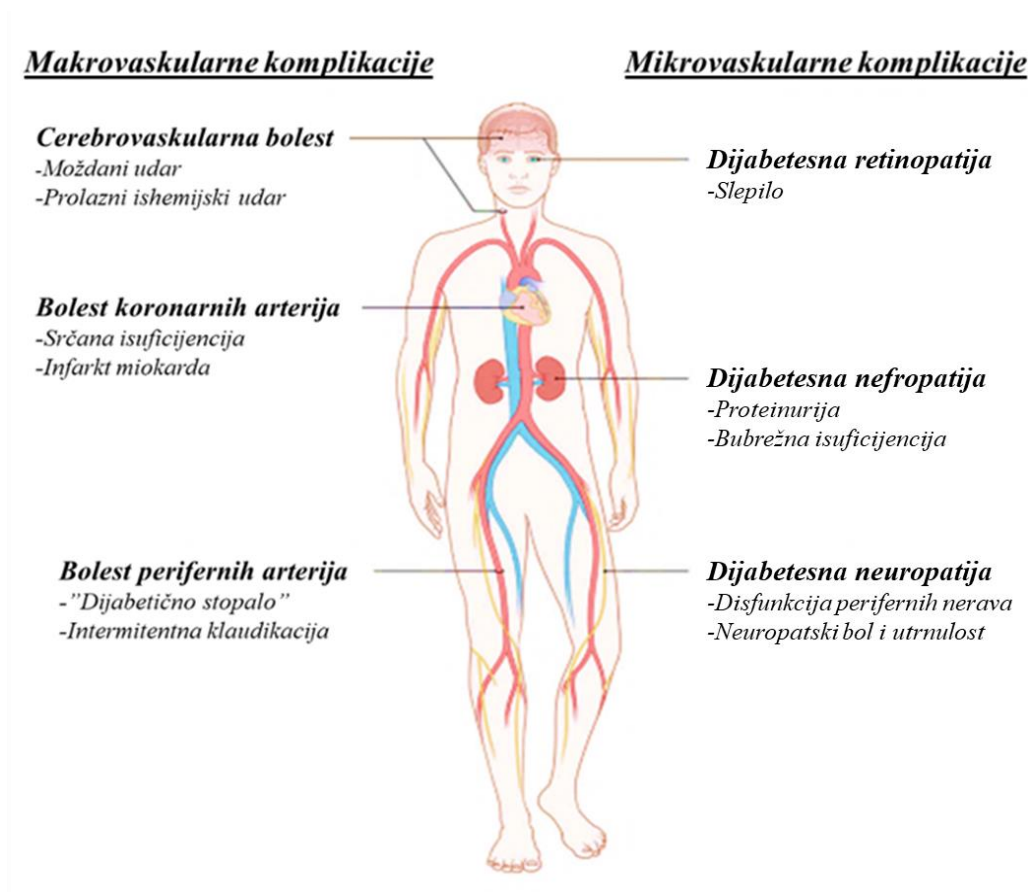
1.5. Vaskularne komplikacije kod pacijenata sa IDDM

1.5.1. Mehanizam nastanka vaskularnih komplikacija

Razvoj vaskularnih komplikacija kod obolelih od DM je složen proces. Smatra se da brojne biohemijske promene nastale usled poremećaja u metabolizmu glukoze mogu doprineti povredi, pre svega, malih krvnih sudova (arteriole, kapilari, venule), njihovom remodelovanju i posledičnoj hipoksiji ćelija i tkiva (Rask-Madsen i King, 2013). Mali krvni sudovi imaju važnu ulogu u održavanju krvnog pritiska, kao i transportu gasova i hranljivih materija do ćelija i tkiva. Poseduju regulatorne sisteme kojima kontrolišu propustljivost nutrijenata i gasova kroz membrane endotelnih ćelija krvnih sudova, kao i mišićnu aktivnost, u svrhu prilagođavanja protoka krvi prema lokalnim metaboličkim potrebama (Orasanu i Plutzky, 2009). DM prate promene malih krvnih sudova, arteriola i kapilara u glomerulima, retini, miokardu, koži i mišićima, a povećanje permeabilnosti membrana i debljine zida krvnih sudova dovodi do razvoja mikroangiopatija (Gordin i Groop, 2016; Stehouwer, 2018).

U neadekvatno regulisanom IDDM, dugotrajna hiperglikemija dovodi do prekomernog opterećenja glavnih puteva metabolizma glukoze i neenzimske glikozilacije brojnih supstrata, što dovodi do povećane potrošnje O_2 u mitohondrijima, stvaranja ROS i posledične hipoksije ćelija i tkiva (Rodriguez-Manas i sar., 2003). Nastalo stanje hipoksije dalje narušava intracelularne oksidativne procese i umanjuje funkcionalnost ćelije (Kitada i sar., 2010). Usled hipoksije dalje dolazi do aktiviranja alternativnih puteva metabolizma glukoze, kao što su: metabolički putevi poliol-sorbitola i protein kinaze C (PKC), put heksozamina i produkata glikozilacije (AGE, *engl. Advance Glycation End-products*). Aktivacija alternativnih puteva metabolizma glukoze dovodi do povećanja oksidativnog stresa što uzrokuje disfunkciju endotela i ubrzanja procesa ateroskleroze (Rodriguez-Manas i sar., 2003; Kitada i sar., 2010). Ubrzana i izražena ateroskleroza kod pacijenata sa IDDM klinički se ispoljava smanjenom funkcijom tkiva i organa nastalih usled nedovoljne vaskularizacije, tj. ishemije tkiva i organa.

U mikrovaskularne komplikacije DM mogu se uvrstiti dijabetesna retinopatija, dijabetesna nefropatija, polineuropatija i mikroangiopatija, a u makrovaskularne komplikacije koronarna, cerebrovaskularna i periferna vaskularna bolest (**Slika 11.**) (Kitada i sar., 2010).



Slika 11. Prikaz mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija izazvanih DM
(preuzeto i modifikovano sa <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/65/2/331.figures-only>)

Nastanak vaskularnih komplikacija je u direktnoj vezi sa stepenom regulacije glikemije kod obolelih od DM (DCCT/EDIC, 2002; Chawla i sar., 2016). Chawla i saradnici su uočili postojanje pozitivne korelacije između neadekvatne kontrole glikemije i razvoja neuropatije i retinopatije kod obolelih od DM (Chawla i sar., 2016). Podaci kliničkih studija, koje su ispitivale vaskularne komplikacije izazvane DM, su pokazali da prisustvo mikrovaskularnih komplikacija (posebno retinopatije i nefropatije) kod pacijenata sa DM može značajno povećati rizik za pojavu ubrzane ateroskleroze koja, posledično kulminira kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim poremećajima, kao i prevremenom smrću (Fuller i sar., 2001; Chen i sar., 2015). Infarkt miokarda predstavlja jedan od glavnih uzroka morbiditeta i mortaliteta kod dijabetičara, a rizik za razvoj infarkta miokarda povećan je za dva do pet puta kod pacijenata sa DM (Haffner i sar., 1998). Takođe, pacijenti sa DM imaju dva do četiri puta veći rizik za nastanak moždanog udara i bolesti perifernih arterija (Jamrozik i sar., 2000).

1.5.2. Faktori rizika za nastanak vaskularnih komplikacija kod pacijenata sa IDDM

Genetska predispozicija, kao i pozitivna porodična anamneza predstavljaju važne faktore rizika razvoja vaskularnih komplikacija kod pacijenata sa DM (Al-Kateb i sar., 2008; Zoungas i sar., 2014). Kod ispitanika koji su učestvovali u DCCT i studiji „Epidemiologija intervencija i komplikacija DM” (EDIC, *engl. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*), identifikovano je nekoliko genetičkih varijanti na lokusima 3q, 7q i 18q, koje povećavaju rizik za razvoj retinopatije i nefropatije kod pacijenata sa DM što ukazuje na genetsku osnovu nastanka DM i razvoja vaskularnih komplikacija (Al-Kateb i sar., 2008).

Godine života i dužina trajanja DM ≥ 10 godina, takođe, utiču na razvoj vaskularnih komplikacija (Zoungas i sar., 2014). Starije osobe kod kojih je došlo do razvoja DM u ranijoj životnoj dobi imaju povećan rizik za razvoj makrovaskularnih komplikacija, koje su učestalije kod žena (Natarajan i sar., 2005). Razvoj mikrovaskularnih komplikacija zavisi od dužine trajanja DM nezavisno od starosne dobi u kojoj je DM nastupio i svako petogodišnje produženje DM povećava rizik za nastanak mikrovaskularnih komplikacija za 28% (Zoungas i sar., 2014).

Među dobro poznatim faktorima rizika za nastanak vaskularnih komplikacija nalaze se i arterijska hipertenzija (HTA), gojaznost, IR, dislipidemija, hiperhomocisteinemija (HHcy) i stanje inflamacije (Orchard i sar., 2003; Liu i sar., 2010; Liu i sar., 2015; Chen i sar., 2015). Kao posledica HTA tokom vremena krvni sudovi postaju manje elastični, usled čega dolazi do zadebljanja zida arterija i formiranja aterosklerotskih plakova (Liu i sar., 2015). Na nivou malih krvnih sudova HTA dovodi do remodelovanja, ali takođe i do smanjivanja broja i dužine krvnih sudova usled čega se smanjuje dotok hranljivih materija, metabolita i O₂ u ćeliju, a time narušava integritet i funkcija ćelija i tkiva (Debbabi i sar., 2006).

Sve je više rezultata koji pokazuju da postoji značajan porast prevalencije gojaznosti i predgojaznosti kod obolelih od IDDM u odnosu na opštu populaciju (Liu i sar., 2010), što ukazuje da gojaznost ima važnu ulogu u patogenezi IDDM (DuBose i sar., 2015). Gojaznost predstavlja poznat faktor rizika za nastanak IR (Levy-Marchal i sar., 2010). IR nastaje kao posledica neosetljivosti perifernih tkiva na dejstvo insulina, a kao posledica toga dolazi do smanjenog iskorišćavanja glukoze kao izvora energije, povećane glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, što sve doprinosi hiperglikemiji (Hunter i Garvey, 1998; Boden, 1999). Kako bi se održala glikemija u okviru referentnih vrednosti, β -ćelije pankreasa

kompenzatorno povećavaju sekreciju insulina u početnoj fazi IR, što dovodi do povećanja koncentracije insulina u krvi, i sledstveno progresivnog smanjenja funkcije β -ćelija (Taylor, 2012). Kod osoba koje imaju IR udruženu sa dislipidemijom, inflamacijom i HTA dolazi do ranijeg nastanka DM i ubrzanog razvoja ateroskleroze (Vaneckova i sar., 2014; Zhou i sar., 2014). Razvoj ateroskleroze uzrokuje ishemijsku bolest donjih ekstremiteta kod obolelih od DM, usled suženja i/ili začepljenja lumena arterija i posledičnog smanjenja protoka krvi i ishranjenosti tkiva, što vremenom umanjuje funkcionalnu sposobnost ekstremiteta (Wattanakit i sar., 2005). Procesu ubrzane ateroskleroze, godinama pre samog kliničkog ispoljavanja DM, doprinose i promene u koncentraciji i sastavu lipida (Haffner i sar., 1990), što se ogleda u povećanoj incidenci morbiditeta i mortaliteta uzrokovanih brojnim kardiovaskularnim komplikacijama (Manninen i sar., 1988). Nezavistan faktor rizika za razvoj brojnih vaskularnih komplikacija u DM predstavlja i visoka koncentracija metabolita metionina, homocisteina (Hcy) u serumu, koja se karakteriše kao stanje hiperhomocisteinemije (HHcy) (Wald i sar., 2002). Pokazano je da HHcy pozitivno korelira sa IR, utiče na povećano stvaranje ROS i oksidaciju LDL uzrokujući disfunkciju endotela, što sve zajedno doprinosi razvoju HTA, ateroskleroze i nastanku vaskularnih komplikacija u DM (Heinecke i sar., 1993; Eikelboom i sar., 2000; Sreckovic i sar., 2017).

Inflamacija ima značajnu ulogu u procesu nastanka i razvoja IDDM i vaskularnih komplikacija (Mandrup-Poulsen, 1996; Duncan i sar., 2003). Brojne studije su ukazale na važnu ulogu inflamacije u razvoju IR i ateroskleroze kod obolelih od DM (Moller, 2000; Rehman i Akash, 2016). Danas je opšte prihvaćeno mišljenje da poremećaj u metabolizmu glukoze i masti u DM mogu da podstaknu nastanak inflamatornih procesa (Maedler i sar., 2002; Meier i sar., 2009). Hiperglikemija i dislipidemija podstiču sintezu inflamatornih citokina koji mogu da inhibiraju funkciju β -ćelija pankreasa, kao molekule signalnog puta insulina (Kawazoe i sar., 2001; Boni-Schnetzler i sar., 2009). Povećana ekspresija citokina indukuje sintezu proteina akutne faze inflamacije u jetri, među kojima je C-reaktivni protein (CRP), važan marker inflamacije, ali takođe i pokazatelj postojanja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija u DM (King i sar., 2003; Aryan i sar., 2018). Uočeno je postojanje veze između visoke koncentracije CRP u serumu i rizika za razvoj DM (Pradhan i sar., 2001; Barzilay i sar., 2001). Takođe, rezultati mnogobrojnih studija su pokazali da postoji pozitivna korelacija između koncentracije CRP i nivoa HbA1c, postojanja IR, kao i ispoljenosti ateroskleroze (Festa i sar., 2000; Wu i sar., 2002; Moran i sar., 2005).

1.5.3. Dijagnoza vaskularnih komplikacija

Dijagnoza vaskularnih komplikacija izazvanih DM uspostavlja se anamnezom i kliničkim pregledom, koji može biti neinvazivan (“Doppler, color duplex” ultrazvučni pregled, magnetna rezonanca i kompjuterizovana tomografija) i invazivan (angiografija) (Hob, 1991).

Princip duplex ultrasonografija se zasniva na kombinaciji prikaza dvodimenzionalne ultrazvučne slike visoke rezolucije i merenja brzine protoka krvi pomoću spektralne analize frekvence i amplitude Doppler talasa (Puttemans i Nemery, 1998).

„Color doppler“ pregled arterija i vena predstavlja ultrazvučnu metodu koja omogućava vizualizaciju različitih morfoloških struktura zida krvnog suda, detektovanje aterosklerotskih plakova, procenjivanje rezidualnog lumena, određivanje stepena suženja krvnog suda, kao i određivanje brzine protoka krvi (Puttemans i Nemery, 1998).

Angiografija predstavlja invazivni dijagnostički postupak kojim se ispituje stanje krvnih sudova ubrizgavanjem hidrosolubilnog kontrastnog sredstva u krvni sud, koji se zatim snima primenom rendgen tehnike (fluoroskopije). U dijagnostici vaskularnih komplikacija primenjuje se i magnetno-rezonantna angiografija ili magnetna angiografija, koja funkcioniše po principima magnetnog polja, radiofrekventnih talasa i kompjuterske obrade podataka, stvarajući dvodimenzionalne slike krvnih sudova. Kompjuterizovana tomografija je radiološka metoda koja pored rendgenskog zračenja, koristi i metodu koja se zasniva na matematičkoj obradi snimaka uz primenu savremenih računara i programskih paketa u cilju stvaranja trodimenzionalnih slika unutrašnjosti krvnih sudova (Bodanapally i sar., 2014).

1.6. Terapija u lečenju DM i vaskularnih komplikacija kod obolelih od DM

Kod pacijenata sa IDDM, terapija insulinom je neophodna i podrazumeva doživotnu primenu. Pored terapije insulinom, savremena terapija IDDM podrazumeva multidisciplinarni pristup u lečenju DM koji osim regulacije nivoa glikemije, podrazumeva i terapiju HTA, ali i svih drugih poremećaja koji predstavljaju faktore rizika za razvoj komplikacija DM, kao što su gojaznost, IR, dislipidemija i HHcy (Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2012).

Terapija DM i vaskularnih komplikacija je složena i obuhvata različite terapijske pristupe, među kojima važno mesto zauzima nefarmakološka terapija, tj. terapija koja podrazumeva uravnoteženu ishranu i fizičku aktivnost (Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2012). Medikamentna terapija kod obolelih od IDDM sastoji se od terapije humanim insulinom ili insulinskim analogima i može se primenjivati u dva oblika: primenom subkutanih injekcija penkalom po konvencionalnom režimu (jedna do dve pojedinačne doze dnevno) ili intenzivnom insulinskom režimu (tri ili više pojedinačnih doza dnevno) i primenom kontinuirane subkutane insulinske infuzije putem spoljne prenosne pumpe (Zaric i sar., 2019). U posebnim slučajevima tretman IDDM uključuje i transplantaciju endokrinog pankreasa, koja se obično obavlja sinhrono sa transplantacijom bubrega. Pokazano je da nakon transplantacije pankreasa može doći do poboljšanja bubrežne funkcije, kao i usporavanja procesa ateroskleroze i posledičnog zaustavljanja progresije mikroangiopatija i polineruopatija (Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2012). Kod obolelih od NIDDM primenjuje se i terapija oralnim antihiperглиkemicima, a često je neophodna i primena antitrombotične, hipolipemijske i antihipertenzivne terapije. Terapija vaskularnih komplikacija često zahteva i lečenje hirurškim putem, koje obuhvata revaskularizaciju krvnih sudova, amputaciju ishemičnih delova tela i lezija (Aboyans i sar., 2018).

Uzimajući u obzir da poremećen balans O_2 u plazmi ima važnu ulogu u patogenezi DM, kao i da terapija insulinom ne dovodi uvek do adekvatne dnevne kontrole nivoa glikemije (Gerstein i sar., 2008), neophodna je primena dodatnih terapija kako bi se usporio nastanak i razvoj vaskularnih komplikacija obolelih od IDDM. Jedna od neinvazivnih terapija koja se pokazala efikasnom u lečenju ishemijskih lezija i vaskularnih komplikacija nastalih kao posledica DM, jeste terapija kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima (HBK) (Kranke i sar., 2004).

1.6.1. Primena terapije kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima (HBK) u lečenju vaskularnih komplikacija kod obolelih od DM

Terapija HBK je naučno utemeljena metoda lečenja vaskularnih komplikacija, koja se zasniva na udisanju 100% O_2 pod uslovima povišenog atmosferskog pritiska od 1,6 do 2,8 ATA u specijalnim hermetički zatvorenim uređajima, tj. hiperbaričnim komorama (**Slika 12.**) (Jain, 2009). Terapija HBK može se vršiti u individualnim hiperbaričnim komorama ili u komorama za više pacijenata (obično od 2 do 14). Individualne hiperbarične komore su

kompresovane sa čistim O₂ i pacijenti su slobodno izloženi u ležećem položaju, dok kod komora sa više mesta pacijenti udišu čist O₂ pod hiperbaričnim uslovima preko zatezne maske za lice ili endotrahejne cevi. U zavisnosti od preporuke lekara, terapija HBK može se izvoditi od 5 do 40 dana, a tretmani HBK mogu trajati jedan do dva sata, jednom do tri puta dnevno (Thom, 1989).



Slika 12. Prikaz hiperbarične komore za jednog pacijenta

(preuzeto sa <http://www.banja-vrucica.com/en/get-healthy/hyperbaric-chamber/>)

Početni efekat povišenog pritiska gasa, pri konstantnoj temperaturi, na ljudsko telo je porast hidrostatičkog pritiska, koji povećava parcijalni pritisak gasova i dovodi do smanjenja zapremine prostora ispunjenih gasom prema Boyle-Marriott-ovom zakonu. Tokom tretmana HBK, rastvorljivost O₂ u plazmi se povećava preko 10 puta (> 2000 mmHg), usled čega se O₂ difuzijom brzo transportuje do udaljenih tkiva (pO₂ u tkivima 200 do 400 mmHg) i na taj način doprinosi očuvanju vitalnosti tkiva, čija je funkcija izmenjena usled nastale ishemije (Thom, 1989).

Indikacije za primenu HBK terapije su: dekompresiona bolest, odloženo oštećenje zračenjem, refraktorni osteomijelitis, termičke opekotine, trovanje ugljen-monoksidom, arterijska gasna embolija itd. (Butler i sar., 2008; Shah, 2010). Takođe, terapija HBK može povoljno uticati na ishod brojnih ishemijskih stanja nastalih kao posledica DM, kao što su cerebralna ishemija, bolest perifernih arterija, gangrenozne rane (dijabetesno stopalo), povrede nastale usled ishemije i reperfuzije, okluzija centralne arterije retine itd. (Visona i sar., 1989; Karadurmus i sar., 2010). Primena terapije HBK se ne preporučuje kod osoba sa bolestima pluća (pneumotoraks), respiratornih i sinusnih infekcije, infekcije uha, visoke

temperature itd. Zavisno od doze i dužine trajanja terapije HBK, kao i stanja pacijenta usled izlaganja HBK, može doći do oksidativne toksičnosti u plućima i nervnom sistemu, acidoze i hemolize (Saltzman, 1965).

Brojne studije su pokazale da terapija HBK pokreće i niz molekulskih mehanizama u organizmu koji dovode do pozitivnih terapijskih efekata, kao što su: poboljšanje sistemske hemodinamike i mikrocirkulacije (Zamboni i sar., 1993; Mathieu i sar., 2006), ubrzavanje angiogeneze (Marx i sar., 1990), pokretanje procesa antioksidativne zaštite (Ansari i sar., 1986), povećavanje proliferacije fibroblasta i sinteze kolagena (Yümün i sar., 2016), inhibicija inflamacije (Benson i sar., 2003; Zhang i sar., 2008) i smanjenje obima aterosklerotskih plakova (Karadurmus i sar., 2010). Povećanje parcijalnog pritiska O₂, koji ostaje povišen od 4 do 6 sati nakon tretmana HBK, obezbeđuje mitohondrijsku respiraciju i preživljavanje ćelija u stanju hipoksije (Thom, 1989), inhibira apoptozu β-ćelija pankreasa (Zhang i sar., 2008; Faleo i sar., 2012), smanjuje adheziju leukocita (Benson i sar., 2003) i poboljšava baktericidnu aktivnost leukocita (Hohn i sar., 1976), što doprinosi smanjenju inflamacije i vaskularnih komplikacija kod pacijenata sa DM (Karadurmus i sar., 2010).

2. Hipoteza

Osnovna hipoteza ove doktorske disertacije je da tretman HBK ostvaruje povoljne efekte kod obolelih od IDDM sa vaskularnim komplikacijama tako što utiče na promenu nivoa i sastava MK u plazmi, kao i na regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima, posredstvom signalnih molekula, kao što su: IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 i NFκB.

U postavci osnovne hipoteze pošlo se od pretpostavke da neadekvatna kontrola IDDM dovodi do hiperglikemije, koja je glavni uzrok hipoksije tkiva, poremećaja u metabolizmu masti i proteina, što dovodi do nastanka inflamacije i disfunkcije endotela, razvoja ateroskleroze i vaskularnih komplikacija kod obolelih od IDDM.

Naučna hipoteza ove doktorske disertacije je da se u limfocitima obolelih od IDDM usled hiperglikemije i hipoksije menja nivo i sastav MK u krvi i povećava ekspresija i aktivnost iNOS. Pretpostavka je da dolazi do povećanja nivoa MK koje dovode do inflamacije (SFA i n-6 PUFA), a smanjenja nivoa MK koje ostvaruju antiinflamatorne i antiaterogene efekte (MUFA i n-3 PUFA), i da se povećava koncentracija markera inflamacije i nivoa IGFBP-1 u krvi. Izmenjen nivo i sastav MK u stanju IDDM dovodi do poremećaja signalnih puteva insulina (IRS-1/PI3K/Akt i ERK1/2), što za posledicu ima aktivaciju NFκB i pokretanje transkripcije gena za iNOS.

Pretpostavlja se da terapija HBK sprečava hipoksiju, smanjuje inflamaciju i vaskularne komplikacije tako što snižava glikemiju, koncentraciju lipida i markera inflamacije, a osim toga menja sastav MK plazme povećavajući nivo pojedinačnih MUFA i n-3 PUFA, a smanjujući nivo pojedinačnih SFA i n-6 PUFA. To dovodi do inhibicije ekspresije NFκB i posledičnog smanjenja ekspresije i aktivnosti iNOS, molekulskim mehanizmom koji uključuje IRS-1, PI3K, Akt i ERK1/2 signalne molekule u limfocitima pacijenata sa IDDM.

3. Ciljevi rada

U skladu sa obrazloženom hipotezom, postavljeni su ciljevi istraživanja obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom.

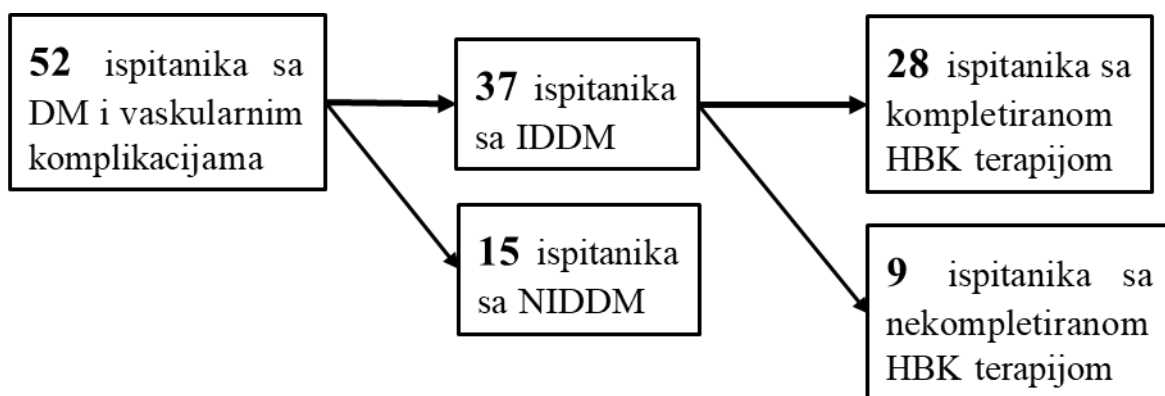
Ciljevi istraživanja bili su izučavanje uticaja terapije HBK na:

1. koncentraciju parametara metabolizma glukoze u plazmi obolelih od IDDM;
2. koncentraciju lipida u plazmi obolelih od IDDM;
3. nivo i sastav MK u plazmi obolelih od IDDM;
4. koncentraciju markera inflamacije kao što su CRP, Hcy i NO u plazmi i serumu obolelih od IDDM;
5. regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima obolelih od IDDM;
6. ekspresiju IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 i NFκB, i ulogu ovih signalnih molekula u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima obolelih od IDDM izloženih terapiji HBK;
7. ekspresiju IGFBP-1 u serumu obolelih od IDDM.

4. Materijal i metode

4.1. Dizajn istraživanja i način izbora ispitanika

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su dizajnirana kao prospektivna pilot studija u saradnji sa Službom za endokrinologiju i dijabetes, Službom za baromedicinu, kao i Odeljenjem internističke intenzivne nege Kliničko-bolničkog centra (KBC) Zemun u Beogradu, u periodu od oktobra 2017. godine do decembra 2018. godine. Ovom studijom je obuhvaćeno 52 ispitanika obolelih od DM i perifernih vaskularnih komplikacija, od kojih je kod 37 ispitanika postavljena dijagnoza IDDM, a kod preostalih 15 ispitanika NIDDM.



Slika 1. Prikaz odabira ispitanika uključenih u studiju

DM- diabetes mellitus; IDDM- insulin-zavisni DM; NIDDM- insulin-nezavisni DM.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju bili su:

1. klinički potvrđen IDDM sa perifernim vaskularnim komplikacijama,
2. odsustvo zapaljenskih procesa i ulceracija na ekstremitetima kao posledica DM,
3. izlaganje terapiji HBK po prvi put,
4. odsustvo kontraindikacija za terapiju HBK.

Od 37 pacijenata sa IDDM i perifernim vaskularnim komplikacijama, ukupno je 28 pacijenata ispunilo sve kriterijume za uključivanje u studiju i kompletiralo terapiju HBK u trajanju od 10 tretmana.

Sve eksperimentalne procedure u okviru ove doktorske disertacije bile su u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije o medicinskim istraživanjima i principima dobre naučne i kliničke prakse. Odobrenje za sprovođenje istraživanja dao je Etički komitet KBC Zemun, Beograd (broj 575/1). Svim pacijentima je pre početka ispitivanja detaljno objašnjen cilj istraživanja i značaj njihovog učešća u njemu. Saglasnost za učešće u istraživanjima pacijenti su dali svojim pismenim pristankom nakon pročitanoog teksta za informisanje pacijenta.

4.2. Postupak regrutovanja ispitanika

Ispitanicima je dijagnoza perifernih vaskularnih komplikacija nastalih usled DM tj. dijabetičnih angiopatija, ustanovljena anamnezom, kliničkim ultrazvučnim pregledom krvnih sudova u matičnim KBC od strane nadležnih radiologa, vaskularnih hirurga i užih specijalista baromedicine. Nakon kliničke potvrde vaskularnih komplikacija nadležna lekarska komisija je uputila ispitanike na odeljenje za baromedicinu, KBC Zemun u skladu sa pravilnikom o načinu, postupku i indikacijama za upućivanje osiguranih lica na lečenje hiperbaričnom oksigenacijom ("Sl. glasnik RS", br. 81/2015 - dalje: Pravilnik).

Pri prvoj poseti lekaru užem specijalisti za baromedicinu KBC Zemun prikupljeni su podaci od ispitanika vezani za demografske (pol i starost) i kliničke karakteristike (tip DM i komorbiditeti), kao i vrstu terapije (grupa lekova, naziv leka, oblik u kome se daje leka, doza i režim doziranja). Neposredno pre početka terapije svim ispitanicima su urađene antropometrijske analize i izmeren je arterijski krvni pritisak sfingomanometrom.

4.3. Terapija HBK

Terapija HBK podrazumevala je izlaganje ispitanika 100% molekulskom kiseoniku pod pritiskom do 2,4 apsolutnih atmosfera (ATA) u individualnim hiperbaričnim komorama Dräger 1000/1200 (Drägerwerk, Libek, Nemačka) u trajanju od 1 sata dnevno tokom 2 nedelje (ukupno 10 tretmana). Ispitanici su tokom bolničkog lečenja bili na adekvatnom režimu ishrane prema savetu lekara (dnevna kalorijska vrednost obroka 1800 kcal, tri obroka i dve užine). Svim ispitanicima su u jutarnjim časovima, nakon dvanaestočasovnog gladovanja, pre početka terapije HBK i posle završenih 10 tretmana HBK, uzeta su po dva uzoraka periferne venske krvi venepunkcijom prednje kubitalne vene za dalje hematološke i biohemijske analize, kao i analizu proteina od interesa (western blot). Za ispitivanje efekta terapije HBK u trajanju od 10 tretmana pacijenti sa IDDM pre terapije HBK predstavljali su sami sebi kontrolu.

4.4. Metode rada

4.4.1. Određivanje antropometrijskih parametara

Sprovedena su sledeća antropometrijska merenja: telesna visina, telesna masa i indeks telesne mase (BMI, *engl. Body Mass Index*). Za merenje telesne visine korišćen je metar sa preciznošću od 0,1 cm, a dobijene vrednosti izražavane su u centrimetrima (cm). Za merenje telesne mase korišćena je medicinska decimalna vaga preciznosti 0,1 kg, a vrednosti su izražavane u kilogramima (kg). BMI je izračunavan kao odnos telesne mase i kvadrata telesne visine izražene u kg/m^2 . Predgojaznost je definisana pri vrednostima BMI od 25 do 30 kg/m^2 , a gojaznost pri vrednostima BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Peytremann-Bridevaux i Santos-Eggimann, 2008).

4.4.2. Merenje krvnog pritiska

Sistolni i dijastolni krvni pritisak ispitanika mereni su pomoću sfingomanometra po metodi Riva-Rocci sa preciznošću od 1 milimetra živinog stuba (mmHg). Merenje je izvršeno u jutarnjim časovima u sedećem položaju, nakon petominutnog mirovanja.

Dobijene vrednosti su izražavane u mmHg. Hipertenzijom se smatraju vrednosti sistolnog pritiska ≥ 140 mmHg i dijastolnog pritiska ≥ 90 mmHg (Lee i sar., 2018).

4.4.3. Određivanje biohemijskih parametara

4.4.3.1. Izdvajanje seruma i plazme iz krvi pacijenata sa IDDM

Nakon uzimanja uzorka krvi serum je izdvajan u epruvete koje nisu sadržale antikoagulans. Nakon perioda potrebnog za koagulaciju (30 minuta), serum je iz krvi izdvojen centrifugiranjem u trajanju od 15 minuta na 3000 rpm, dok je plazma izdvajana u epruvete sa antikoagulanom (EDTA, *engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid*), centrifugiranjem na sobnoj temperaturi, 15 minuta na 4000 rpm na kliničkoj centrifugi Rotofix 32A (Hettich, Tuttlingen, Nemačka). Iz dobijenih supernatata (plazma i serum) odmah su urađene određene biohemijske analize, dok je ostatak supernatata alikvotiran i čuvan na -20 °C za dalje biohemijske, hormonske i molekulske analize.

4.4.3.2. Hematološke analize pacijenata sa IDDM

Od hematoloških analiza određivana je kompletna krvna slika: broj leukocita, eritrocita i trombocita, kao i nivo hemoglobina (Hb) i hematokrita iz uzorka pune krvi ispitanika. Analiza kompletne krvne slike određivana je metodom protočne citometrije, uz korišćenje Beckman Coulter reagenasa na automatskom hematološkom brojaču DxC 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD).

4.4.3.3. Određivanje koncentracije parametara metabolizma glukoze

4.4.3.3.1. *Određivanje nivoa glikozilovanog hemoglobina (HbA1c) u krvi pacijenata sa IDDM*

Nivo HbA1c u krvi određivan je iz uzorka pune krvi imuno-inhibicionom metodom na automatskom analizatoru Cobas c 501 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Švajcarska), uz korišćenje kompleta reagenasa istoimenog proizvođača.

Predtretman uzorka za kvantitativno određivanje nivoa HbA1c u krvi, sastoji se od tretiranja uzoraka pune krvi lizirajućim reagensom kako bi se oslobodio Hb iz eritrocita. Dodavanjem natrijum lauril sulfata (SLS, *engl. Sodium Lauryl Sulfate*) nastaju Hb-SLS kompleksi, čiji je apsorpcioni maksimum očitavan na 525 nm. Koncentracija Hb-SLS kompleksa je proporcionalna koncentraciji ukupnog Hb u uzorku.

Kako bi se odredio nivo HbA1c u krvi iz druge frakcije uzorka izvršena je denaturacija HbA1c lizirajućim reagensom (kalijum fericijanid i saharoza laurat). Princip metode se zasniva na vezivanju denaturisanog HbA1c iz uzorka za anti-HbA1c antitela imobilisana na lateks česticama. U inhibicionoj reakciji aglutinacije dolazi do vezivanja viška anti-HbA1c antitela dodavanjem aglutinatora sa sintetičkim antigenima. Koncentracija HbA1c određivana je merenjem inhibicione reakcije aglutinacije na talasnoj dužini od 625 nm. Nivo HbA1c izražavan je kao % u odnosu na ukupni Hb u krvi. Prisustvo DM je potvrđeno onda kada je izmerena vrednost iznosila HbA1c \geq 6,5%.

4.4.3.3.2. Određivanje glikemije pacijenata sa IDDM

Glikemija ispitanika određivana je iz uzorka seruma pacijenata sa IDDM korišćenjem GLUC-PAP kompleta (Randox, Crumlin, Velika Britanija) na automatskom biohemijskom analizatoru Rx Daytona (Randox, Crumlin, Velika Britanija), prema uputstvu proizvođača.

Određivanje glikemije zasniva se na reakciji oksidacije glukoze u glukonsku kiselinu i vodonik peroksid (H_2O_2) u prisustvu enzima glukozo-oksidade. Nastali H_2O_2 reaguje sa 4-aminofenazonom i fenolom u prisustvu peroksidaze, gradeći iminohinon i vodu. Stvaranje iminohinona dovodi do promene boje reakcione smeše, čiji je intenzitet određivan merenjem apsorbancije svetlosti na talasnoj dužini od 505 nm. Intenzitet nastale iminohinonske boje direktno je proporcionalan nivou glukoze u krvi. Glikemija je izražavana u mmol/l.

4.4.3.3. Određivanje koncentracije insulina u serumu pacijenata sa IDDM

Koncentracija insulina određivana je iz uzorka seruma ispitanika radioimunološkom (RIA; *engl. Radioimmunoassay*) metodom uz korišćenje RIA INS (PEG) komercijalnog kompleta (INEP, Zemun, R. Srbija) na gama-scintilacionom brojaču 1219 RackBeta (LKB, Belgija).

Određivanje koncentracije insulina u serumu zasniva se na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka i radioaktivno obeleženog (J^{125}) insulina za određeni broj epitopa na specifičnim anti-insulin antitelima (Kagan, 1975). Na ovaj način nastali radioaktivno obeleženi i neobeleženi imuno kompleksi dalje se talože uz pomoć imunoadsorbenta (30 minuta na sobnoj temperaturi), dok nevezani insulin (obeleženi i neobeleženi) i antitela ostaju u tečnoj fazi. Koncentracija obeleženih kompleksa određivana je na osnovu očitavanja radioaktivnosti imuno kompleksa na gama-scintilacionom brojaču. Koncentracija obeleženih kompleksa obrnuto je proporcionalna koncentraciji insulina u uzorku.

Postupak je izvođen tako što je u 50 μ l alikvota seruma ispitanika dodavano 50 μ l J^{125} - insulina i 50 μ l anti-insulin antitela. Sadržaj je mešan na vorteksu i inkubiran na sobnoj temperaturi 20 sati, nakon čega je dodavano 250 μ l imunoadsorbenta. Sadržaj je potom mešan i inkubiran na sobnoj temperaturi 30 minuta, nakon čega je centrifugiran 25 minuta na 3000 rcf. Nakon toga je supernatant uklanjan, a iz taloga je merena radioaktivnost na gama-scintilacionom brojaču 1219 RackBeta (LKB, Belgija). Koncentracija insulina je određivana na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem serije standarda poznate koncentracije insulina (od 3,125 do 100 mIU/ml) i izražavana u mIU/ml seruma.

4.4.3.4. Određivanje koncentracije parametara lipidnog profila

Koncentracija ukupnog holesterola, Tg i HDL u plazmi ispitanika određivana je standardizovanom metodom enzimskog bojenja na automatskom analizatoru Cobas Integra 400+ (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Švajcarska), korišćenjem komercijalnih kompleta istog proizvođača.

Vrednosti holesterola bez HDL (zbir lipoproteina vrlo male gustine (VLDL, *engl. Very Low Density Lipoproteins*) i LDL, tj. svih lipoproteina koji sadrže apo B-100), LDL, rizika ateroskleroze i rizika kardiovaskularnih bolesti, izračunavani su na sledeći način: koncentracija holesterola bez HDL izračunavana je kao razlika koncentracije ukupnog holesterola i HDL.

Koncentracija LDL određivana je korišćenjem jednačine po Friedewaldu i saradnicima (Friedewald i sar., 1972):

$$\text{LDL} = \text{ukupni holesterol} - \text{HDL} - 0,45 \times \text{Tg [mmol/l]}.$$

Rizik ateroskleroze predstavljen je kao količnik koncentracije LDL i HDL, a rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti kao količnik koncentracije ukupnog holesterola i HDL (Dobiasova, 2006). Koncentracija lipida u plazmi izražavana je u mmol/l.

4.4.3.5. Određivanje koncentracije fosfolipida u plazmi pacijenata sa IDDM

Koncentracija fosfolipida u plazmi ispitanika određivana je kolorimetrijskom metodom po Stjuartu sa manjim modifikacijama (Stewart, 1980). Princip Stjuartovog eseja se zasniva na tome da ekstrahovani fosfolipidi u prisustvu vodenog rastvora gvožđe(III)hlorid hekshidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) i amonijum tiocijanata (NH_4SCN) grade obojeni kompleks rastvorljiv u hloroformu, čija se apsorbancija očitava na talasnoj dužini od 485 nm.

Postupak je izvođen tako što je u 300 μl plazme ispitanika dodavano 600 μl smeše (hloroform: metanol u odnosu 2 : 1). Dobijena smeša je mućkana 20 sekundi, a potom centrifugirana na sobnoj temperaturi, 3 minuta na 7000 rpm na centrifugi Galaxy 16DH (VWR, Radnor, PA, SAD). U donji (hloroformski) sloj, u kome se nalaze ekstrahovani fosfolipidi, dodavano je po 400 μl hloroforma, a potom i po 500 μl reakcionog reagensa (amonijum-ferotocijanat). Dobijena smeša je mućkana 20 sekundi, a potom centrifugirana 10 minutana 1000 rpm. Nakon uklanjanja gornjeg sloja merena je optička gustina uzorka i standarda prema slepoj probi na 485 nm, korišćenjem spektrofotometra SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Za konstruisanje standardne krive korišćene su vrednosti apsorbanci očitavanih za seriju rastvora L- α -

fosfatidinholina poznate koncentracije (od 0,005 do 0,14 mg/ml). Koncentracija fosfolipida je izražavana u mg/ml.

4.4.3.6. Određivanje koncentracije slobodnih MK (SMK) u plazmi pacijenata sa IDDM

Koncentracija SMK u plazmi pacijenata sa IDDM određivana je modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Dunkombu (Duncombe, 1964). Princip metode se zasniva na činjenici da ekstrahovane SMK u hloroformu, u prisustvu odgovarajućeg reagensa, grade soli bakra. Kada soli bakra dođu u kontakt sa dietilditiokarbamatom (DDC, *engl. Diethyl-Dithiocarbamate*) stvara se kompleksno jedinjenje žute boje, sa maksimumom apsorbcancije svetlosti na talasnoj dužini od 436 nm.

SMK su određivane tako što je u 45 µl plazme ispitanika dodavano po 225 µl trietanolaminskog (TEA) pufera (vodeni rastvor $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ kome je postepeno dodavan 7,5 M TEA i podešen pH na 7,8) i kratko mućkano. U dobijenu smešu potom je dodavano po 1125 µl hloroforma i snažno mućkano 20 minuta, čemu je usledilo centrifugiranje 10 minuta na 3000 rpm na centrifugi Galaxy 14D (VWR, Radnor, PA, SAD). Nakon toga uklanjan je gornji plavo-zeleni sloj (koji sadrži proteine), a u 450 µl preostalog hloroformskog sloja (koji sadrži ekstrahovane SMK) dodavano je po 45 µl 0,2 % DDC. Nakon snažnog mućkanja uzorci su inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija uzoraka i standarda je određivana prema slepoj probi u spektrofotometru SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Intenzitet boje novonastalog jedinjenja je proporcionalan koncentraciji SMK. Za konstruisanje standardne krive korišćene su vrednosti apsorbcanci očitavanih za seriju rastvora palmitinske kiseline poznate koncentracije (od 0,1 do 2,5 mmol/l). Koncentracija SMK je izražavana u mmol/l.

4.4.3.7. Određivanje nivoa pojedinačnih MK u plazmi pacijenata sa IDDM

Određivanje udela pojedinačnih MK u sastavu ukupnih MK lipida plazme pacijenata sa IDDM vršeno je prema modifikovanom postupku po Glaseru i saradnicima (Glaser i sar., 2010). Priprema uzorka za određivanje MK podrazumevala

je mešanje 100 μ l uzorka plazme sa 1,5 ml 3 M rastvora metanola u HCl u trajanju od 30 sekundi, u borosilikatnim staklenim epruветama. Zatim je vršena kisela hidroliza estara MK, njihovo oslobađanje i prevođenje u metil- derivate na temperaturi od 85 °C u trajanju od 45 minuta Nakon hlađenja uzoraka na sobnoj temperaturi, ekstrahovane su lipidne frakcije dodavanjem 1 ml n-heksana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), a potom je smeša centrifugirana 10 minuta na 1800 rpm. Nakon toga je izdvojeni heksanski sloj (oko 600 μ l) uparavan do suva u struji azota. Dobijeni uzorci su resuspendovani u 10 μ l n-heksana, a potom je 1 μ l uzorka nanošen na kolonu gasnog hromatografa (Shimadzu 2014, Restek, Bellefonte, PA, SAD). Sastav MK u lipidnom ekstraktu određivan je nakon hromatografskog razdvajanja metil-estara MK metodom gasne hromatografije, korišćenjem kapilarne kolone Restek Rtx 2330 (60 m \times 0,25 mm \times 0,2 μ m). Početna temperatura kolone iznosila je 140 °C, a zatim se temperatura kolone povećavala za 3 °C u minutu do 210 °C. Pojedinačne MK su identifikovane na osnovu retencionih vremena metil-estara MK iz standardne smeše PUFA-2 (Supelco, Inc., Bellefonte, PE, SAD). Nivo pojedinačnih MK prikazan je kao procentualni udeo pojedinačnih MK u odnosu na sastav ukupnih MK plazme.

4.4.3.8. Određivanje aktivnosti elongaze i desaturaza MK

Pored određivanja sastava MK u plazmi, izračunavana je i aktivnost enzima uključenih u elongaciju i desaturaciju MK elongaza i desaturaza Δ 5, Δ 6 i Δ 9. Aktivnosti ovih enzima dobijene su izračunavanjem po dole prikazanim formulama (Green i sar., 2010; Harding i sar., 2015):

$$\text{Elongaza MK} = \frac{\text{Stearinska kiselina, 18:0 (\%)} + \text{Oleinska kiselina, 18:1 (\%)}}{\text{Palmitinska kiselina, 16:0 (\%)}}$$

$$\Delta 5 \text{ desaturaza} = \frac{\text{Arahidonska kiselina, 20:4 (\%)} + \text{Dihomo-}\gamma\text{-linolna kiselina, 20:3 (\%)}}{\text{Linolna kiselina, 18:2 (\%)}}$$

$$\Delta 6 \text{ desaturaza} = \frac{\text{}\gamma\text{-linolna kiselina, 18:3 (\%)}}{\text{Linolna kiselina, 18:2 (\%)}}$$

$$\Delta 9 \text{ desaturaza} = \frac{\text{Palmitoleinska kiselina, 16:1 (\%)}}{\text{Palmitinska kiselina, 16:0 (\%)}}$$

4.4.3.9. Određivanje koncentracije markera inflamacije

4.4.3.9.1. *Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu pacijenata sa IDDM*

Koncentracija CRP određivana je iz uzorka seruma pacijenata sa IDDM imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru Cobas c 501 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Švajcarska), uz korišćenje kompleta reagenasa istoimenog proizvođača.

Princip metode zasniva se na reakciji antigen-antitelo u kojoj se CRP vezuje za humano anti-CRP antitelo imobilisano na lateks česticama, pri čemu nastaju nerastvorljivi imuno kompleksi. Ovako nastali imuno kompleksi povećavaju rasipanje svetlosti, tj. smanjuju intenzitet propuštene svetlosti. Rasipanje svetlosti meri se turbidimetrijski odnosno merenjem zamućenosti (*engl. turbidity*) na 570 nm. Smanjen intenzitet propuštene svetlosti nerastvorljivih imuno kompleksa proporcionalan je koncentraciji CRP u serumu, određivane na osnovu standardne krive konstruisane prema seriji standarda poznate koncentracije CRP. Smatra se da inflamacija postoji ako je izmerena koncentracija CRP izražavana je u mg/l. Prisustvo inflamacije je definisano pri izmerenoj koncentraciji CRP ≥ 5 mg/l.

4.4.3.9.2. *Određivanje koncentracije homocisteina (Hcy) u plazmi pacijenata sa IDDM*

Koncentracija Hcy iz uzorka plazme ispitanika određivana je metodom fluorescentne polarizacije imunoanalize (FPIA) uz korišćenje komercijalnih kompleta firme Abbott za kvantitativno određivanje ukupne količine L-Hcy u humanim uzorcima, na biohemijском analizatoru AxSYM (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD), prema uputstvu proizvođača (Stauffenberg i sar., 2004).

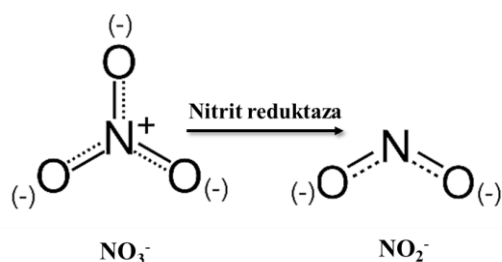
Princip metode zasniva se na redukovanju Hcy vezanog za proteine u plazmi uz pomoć ditiotreitola (DTT, *engl. Dithiothreitol*), do slobodnog Hcy, pri čemu se slobodan Hcy konvertuje u S-adenozil-L-Hcy (SAH) u prisustvu enzima SAH hidrolaze, uz oslobađanje adenzina. SAH i fluorescentno obeleženi SAH se kompetitivno vezuju za određeni broj epitopa na specifičnim monoklonskim anti-SAH

antitelima, pri čemu nastaju fluorescentno obeleženi i neobeleženi imuno kompleksi. Intenzitet polarizovane fluorescentne svetlosti obeleženih imuno kompleksa određivan je u FPIA optičkom analizatoru. Koncentracija Hcy u uzorku obrnuto je proporcionalna koncentraciji obeleženih kompleksa i izražavana je u $\mu\text{mol/l}$. HHcy je stanje utvrđeno pri izmerenoj vrednosti Hcy $\geq 12 \mu\text{mol/l}$ (Castanon i sar., 2007).

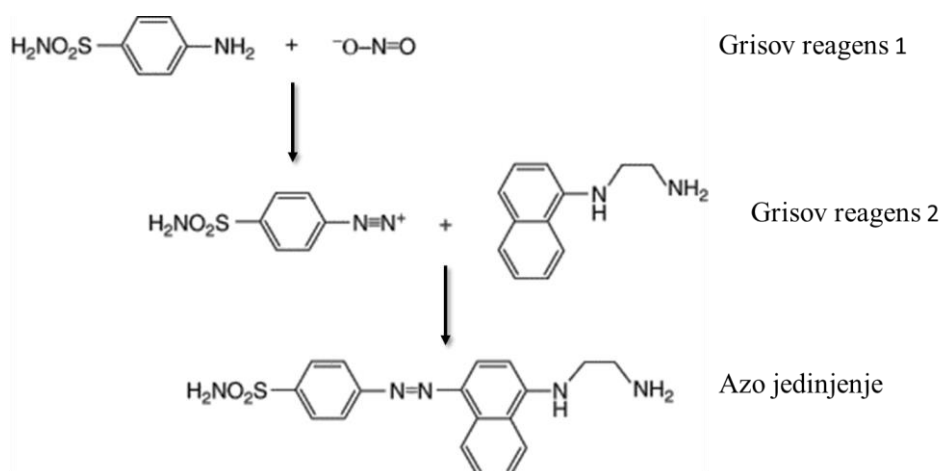
4.4.3.9.3. Određivanje koncentracije nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-) u serumu kao krajnjih produkata NO

Koncentracija NO u serumu određivana je indirektno, merenjem koncentracije NO_2^- i NO_3^- kao krajnjih produkata oksidacije *in vivo* NO. Koncentracija NO_2^- i NO_3^- određivana je modifikovanom kolorimetrijskom metodom nitrat reduktaze i Grisovom reakcijom (Hevel i Marletta, 1994), korišćenjem $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ kompleta (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, SAD) na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer, SAD), prema upustu proizvođača.

Princip metode zasniva se na dvostepenoj reakciji, u kojoj se uz pomoć koenzima $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ zavisne-nitrat reduktaze, NO_3^- konvertuju u NO_2^- (**Slika 2.**). Dodatkom Grisovog reagensa, dobijeni NO_2^- gradi purpurno azo jedinjenje sa maksimumom apsorbancije na 570 nm (**Slika 3.**). Merenjem apsorbancije nastalog azo jedinjenja određivana je koncentracija NO. Esej je rađen u mikrotitarskoj polistirenskoj ploči sa 96 bunarića. Nakon nanošenja serije standarda NO_3^- poznate koncentracije i uzoraka seruma u mikrotitar ploču u volumenu od 80 μl , u svaki bunarić dodavano je po 10 μl kofaktora enzima (BH_4 , CaM, FAD, FMN i hem), a potom po 10 μl nitrat reduktaze. Nakon 3 sata inkubacije na 37 °C u svaki bunarić dodavano je 50 μl Grisovog reagensa 1, a odmah potom i 50 μl Grisovog reagensa 2. Nakon inkubacije od 10 minuta, očitavana je apsorbancija na 570 nm. Koncentracija NO_3^- je određivana korišćenjem standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitanih za seriju poznatih koncentracija rastvora kalijum nitrata (KNO_3). Koncentracija NO_2^- i NO_3^- u serumu izražavana je u μmol .



Slika 2. Konverzija nitrata u nitrite



Slika 3. Konverzija nitrita u Azo jedinjenje

4.4.3.10. Određivanje aktivnosti arginaze u serumu pacijenata sa IDDM

Aktivnost arginaze u uzorku seruma ispitanika određivana je spektrofotometrijskom metodom po Koralizi i saradnicima (Corraliza i sar., 1994). Princip metode zasniva se na konvertovanju L-arginina u ureu i L-ornitin pod delovanjem enzima arginaze, u prisustvu isonitrosopropiofenona (ISPF). Količina nastale uree u ovoj reakciji proporcionalna je aktivnosti enzima arginaze.

Postupak je izvođen tako što su alikvoti od 100 μl seruma inkubirani 10 minuta na 55 $^{\circ}\text{C}$ u 50 μl reakcione smeše „R1“ bez arginina: 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 7,5). Reakcija je inicirana dodavanjem 50 μl smeše „R2“: 0,5 M L-Arg, 1% Na_2CO_3 / 0,5% NaHCO_3 , pH 9,7 (L-arginine monohydrochloride, Kemika, Zagreb, R. Hrvatska), u 50 μl aktiviranog uzorka i nastavkom inkubacije u trajanju od 1 sata na 37 $^{\circ}\text{C}$. Reakcija je potom zaustavljena dodavanjem 800 μl reakcione smeše „R3“: H_2SO_4 :

H₃PO₄ : H₂O u odnosu 1 : 3 : 7, i 50 µl smeše „R4“: 9% ISPF u 100% etanola (ISPF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), zagrevanjem 45 minuta na 100°C. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, očitavana je apsorbancija na 550 nm na spektrofotometru Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska).

Aktivnost arginaze je određivana korišćenjem standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitanih za seriju poznatih koncentracija rastvora uree (Urea, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Aktivnost arginaze izražavana je u nmol uree/minuta/mg proteina.

4.4.4. Izolacija limfocita iz krvi pacijenata sa IDDM

Iz svežih uzoraka pune periferne krvi ispitanika, koja je uzimana u epruvete sa dodatkom antikoagulansa (EDTA), izolovane su mononuklearne ćelije, koje čine od 70% do 90% limfocita i od 10% do 20% monocita, uz pomoć medijuma za razdvajanje limfocita (LSM, *engl. Lymphocyte separation media*; Lymphosep, BioWest S.A.S, Nuaille, Francuska), centrifugiranjem na gradijentu gustine po Bojumu (Boyum, 1968).

Postupak je izvođen tako što je na dno sterilne epruvete nanošeno 3 ml LSM, a zatim je pažljivo nasloženo 5 ml razblaženog uzorka (uzorak pune krvi i 0,9% NaCl u odnosu 1 : 1), kako bi se sprečilo mešanje ova dva sloja. Zatim je usledilo centrifugiranje 30 minuta na 1600 rpm na sobnoj temperaturi, na centrifugi Rotofix 32A (Hettich, Tuttlingen, Nemačka). Na osnovu razlike u gustini, prilikom centrifugiranja, razdvajaju se različite komponente krvi. Na vrhu se izdvaja plazma, u sloju između plazme i LSM nalazili su se limfociti, dok su u talogu ostajali polimorfonuklearni leukociti i eritrociti. Pipetom je pažljivo sakupljen beličasti međusloj, sačinjen od leukocita, i alikvotiran u tube zapremine 2 ml. Sadržaj tuba je zatim ispiran tri puta sa po 2 ml 1 x PBS puferom, centrifugiranjem 10 minuta na 1200 rpm, na sobnoj temperaturi. Nakon poslednjeg ispiranja, PBS je bio odliven, a talozi limfocita su bili kratko sušeni na vazduhu, i odmah zatim bili zamrzavani na -70 °C za dalje analize.

U cilju usporavanja svih ćelijskih procesa, uključujući i degradaciju proteina od trenutka uzimanja krvi do trenutka početka izolacije limfocita, krv je čuvana na hladnom (+4 °C). Takođe, korišćeni su hladni rastvori za razblaživanje krvi i ispiranje taloga limfocita.

4.4.5. Analiza ekspresije proteina iz lizata limfocita

4.4.5.1. Izolacija ukupnih proteina iz lizata limfocita pacijenata sa IDDM

Ukupni proteini izolovani su iz taloga limfocita izdvojenih iz 9 ml pune periferne krvi ispitanika. Talози limfocita su resuspendovani na ledu u 200 μ l pufera za liziranje (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% nejonskog detrdženta Triton X-100, 10% glicerol, pH 7,4) sa dodatkom koktela inhibitora proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka) i koktela inhibitora fosfataza (PhosSTOP, EASYpack, Roche, Nemačka). Limfociti su lizirani inkubiranjem u puferu za liziranje uz rotaciju u trajanju od 1 sata na +4 °C. Nakon liziranja limfocita, odvajani su supernatanti centrifugiranjem uzoraka u trajanju od 20 minuta pri brzini od 14000 rpm na +4 °C na centrifugi Eppendorf 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka). Supernatanti su potom čuvani na -70 °C za merenje ekspresije proteina Western blot metodom.

4.4.5.2. Određivanje koncentracije proteina iz lizata limfocita i seruma pacijenata sa IDDM

Koncentracija proteina iz limfocita i seruma ispitanika određivana je spektrofotometrijskom metodom po Loriju i saradnicima (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na merenju apsorbanije dva obojena kompleksa. Prvi kompleks je biuretski, formira se u baznoj sredini između jona bakra i azota peptidnih veza, a drugi kompleks je Folin-Šialteov reagens (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina) u redukovanom stanju. Folin-Šialteov reagens je u oksidovanom stanju žute boje, a pri redukciji aminokiselinama tirozinom, triptofanom i cisteinom, menja boju u plavo. Kod ove metode intenzitet boje proporcionalan je broju peptidnih veza i broju redukujućih grupa.

Postupak je izvođen tako što je zapremina od 5 μ l resuspendovanog taloga limfocita i seruma razblaživana sa 495 μ l dejonizovane vode, a potom je 25 μ l već razblaženog uzorka dodatno razblaživano još četiri puta. U tube sa 100 μ l razblaženog resuspendovanog taloga i seruma dodavano je 100 μ l vodenog rastvora 2% natrijum dodecil sulfata (SDS, *engl. Sodium Dodecyl Sulphate*) i blago mešano na vorteksu,

nakon čega je dodavano po 1 ml radnog reagensa (1% rastvora Na-K tartarata u 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ koji je prethodno 25 puta razblažen u 2% rastvora Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH). Nakon mešanja, sadržaj epruvete je inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta, a potom je u inkubacionu smešu dodavano 100 μl Folin-Šialteovog reagensa u odnosu 1 : 2, i sadržaj tube mešan na vorteksu. Nakon inkubiranja 20 minuta u mraku, izmerena je apsorbancija na 750 nm na spektrofotometru SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Intenzitet dobijene boje proporcionalan je koncentraciji proteina. Standardna kriva je konstruisana na osnovu vrednosti apsorbancija očitavanih za seriju rastvora albumina iz seruma govečeta (BSA, *engl. Bovine Serum Albumin*) poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Koncentracija proteina izražavana je u $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.4.5.3. Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Metoda SDS-PAGE (*engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) je korišćena za određivanje nivoa ekspresije proteina izolovanih iz lizata limfocita i seruma ispitanika (Laemmli, 1970). Princip metode zasniva se na razdvajanju denaturisanih proteina na osnovu njihovih različitih molekulskih masa u puferu bazne pH vrednosti. U cilju postizanja visokog stepena razdvajanja proteina na osnovu molekulske mase, korišćen je 4% gel za koncentrovanje proteina (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, amonijumpersulfat (APS), TEMED i H_2O), a 10% ili 12% gel za razdvajanje proteina (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H_2O). Korišćen je pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H_2O), kao i pufer u kome se pripremaju uzorci proteina za SDS-PAGE, tj. pet puta koncentrovani Lemli pufer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,5% 2- β -mercaptoetanol, 0,1% bromfenol plavo).

Priprema uzoraka za SDS-PAGE sastojala se od njihovog svođenja na istu koncentraciju od 2,2 mg/ml dodatkom određene zapremine pufera za liziranje, a potom je u uzorke dodavan pet puta koncentrovani Lemli pufer, u odnosu 1 : 5. Koncentracija proteina u pripremljenom uzorku za elektroforezu iznosila je 2 mg/ml. Ovako pripremljeni uzorci kuvani su pet minuta na 95 °C, a potom hlađeni na sobnoj

temperaturi. U sledećem koraku nanošeno je 20 μ l pripremljenog uzorka (40 μ g ukupnih proteina) u bunariće gela koji su zatim razdvajani pomoću aparature za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell electrophoresis, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD). Uzorci su prvo izlagani naponu od 90 V u trajanju 40 minuta, a zatim naponu od 110V u trajanju 90 minuta.

Po završetku elektroforeze, lokalizovanje ispitivanih proteina prema molekulskoj masi, određivano je korišćenjem 4 μ l proteinskog markera- proteina (PageRegular™ Prestained Protein Ladder Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), poznatih molekulskih masa: 10, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa.

4.4.5.4. Western blot

Po završetku elektroforeze, vršena je detekcija nivoa specifičnih proteina u lizatima limfocita i serumu ispitanika Imuno blot, tj. Western blot analizom, koja predstavlja semikvantitativnu metodu za analizu proteina. Ispitivani proteini se identifikuju korišćenjem specifičnih antitela koja prepoznaju određene aminokiselinske sekvence tj. epitope na proteinu od interesa i vezuju se za njih. Nakon elektroforeze, razdvojene proteinske frakcije se transportuju na membranu kako bi se omogućilo specifično vezivanje antitela za ispitivane proteine.

Transfer razdvojenih proteinskih frakcija sa gelova na PVDF membrane (Immobilon-P membrana, veličine pora 0,45 μ m, Millipore Corporation, USA), vršen je u aparatu za mokri transfer (Mini Trans-Blot Cell BioRad laboratories, Hercules, CA, SAD) tokom 60 minuta pri konstantnoj struji od 360 mA na +4 °C, uz korišćenje pufera za transfer (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicin i 20% metanol). Uspešnost transfera proteina na membranu proveravana je bojenjem membrana u trajanju od jednog minuta, uz pomoć rastvora Ponso S (0,1% Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini, koji je prethodno razblaživan sa istom zapreminom TBS-T pufera (25 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween, pH 8,3). Nakon vizualizacije proteinskih traka na membranama, višak rastvora Ponso S uklanja se ispiranjem membrana prvo destilovanom vodom, a potom i TBS-T puferom. Membrane su potom inkubirane u trajanju od dva sata na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA ili nemasno mleko u TBS-T), kako bi se smanjilo nespecifično vezivanje antitela za

membranu. Nakon toga, uklanjan je višak pufera za blokiranje ispiranjem membrana u TBS-T puferu, a zatim su membrane inkubirane sa specifičnim primarnim antitelima preko noći, uz konstantnu rotaciju na +4 °C. Primarna antitela su razblaživana po preporuci proizvođača, do odgovarajućih koncentracija, u 5% BSA ili nemasno mleko u TBS-T (**Tabela 1.**). Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane tri puta po pet minuta TBS-T puferom na sobnoj temperaturi.

Tabela 1. Spisak primarnih antitela korišćenih prilikom analize proteina

Primarno antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Korišćeno razblaženje
anti- β -aktin	Santa Cruz Biotechnology	sc-81178	1:1000
anti-iNOS	Abcam	ab3523	1:500
anti-NF κ B-p65	Santa Cruz Biotechnology	sc-372	1:500
anti-p-NF κ B-p65 (Ser ⁵³⁶),	Cell Signaling	sc-93H1	1:500
anti-IRS-1	Santa Cruz Biotechnology	#2382	1:1000
anti-p-IRS-1 (Ser ³⁰⁷)	Santa Cruz Biotechnology	sc-33956	1:1000
anti-PI3K p85	Abcam	ab40755	1:1000
anti-PI3K p110 α	Cell Signalling	C73F8	1:1000
anti-p-Akt (Ser ⁴⁷³)	Cell Signaling	#9271	1:1000
anti-p-Akt (Thr ³⁰⁸)	Abcam	ab66134	1:500
anti-Akt	Cell Signaling	#9272	1:1000
anti-pERK1/2(Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Cell Signalling	#9101	1:2000
anti-ERK1/2	Cell Signaling	#9102	1:2000
anti-IGFBP-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-6072	1:1000

iNOS- inducibilna azot-monoksid-sintaza; NF κ B-p65- p65 subjednica nuklearnog faktora kappa B; p- fosforilisana forma; Ser- serin; IRS-1- supstrat receptora za insulin-1; PI3K-p85- p85 regulatorna subjednica fosfatidilinozitol 3 kinaze; PI3K-p110- katalitička subjednica fosfatidilinozitol 3 kinaze; Akt- protein kinaza B; Thr- treonin; ERK 1/2 - kinaza regulisana vanćelijskim signalima 1 i 2; Tyr- tirozin; IGFBP-1- protein koji vezuje faktor rasta sličan insulinu 1.

Membrane su zatim inkubirane u trajanju od 60 minuta, uz mešanje na sobnoj temperaturi, sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti-zečija, anti-mišija, ili anti-kozija; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, CA, SAD i Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Sekundarna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom (ALP) ili HRP, su prethodno razblaživana do odgovarajuće koncentracije u 5% rastvoru

BSA ili nemasnom mleku u TBS-T. Nakon toga, membrane su ispirane TBS-T puferom šest puta po pet minuta na sobnoj temperaturi. Analizirani proteini u uzorku su uočavani bojenom reakcijom na samoj membrani nanošenjem supstrata za ALP (BCIP/NBT, *engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride*) ili supstrata za HRP (ECL, *engl. Enhanced Chemiluminescence*).

Postupak ALP metode izvođen je inkubiranjem membrana u 9,8 ml pufera (0,1 M Tris- HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂) kome je dodavano 200 µl reagensa BCIP/NBT (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, SAD), uz blago mešanje u mraku, na sobnoj temperaturi, do razvijanja boje. Metoda se zasniva na defosforilaciji BCIP pod dejstvom ALP, pri čemu nastali produkt interaguje sa NBT formirajući plavo-ljubičasto obojeno jedinjenje. Nakon pojavljivanja signala u vidu plavo-ljubičastih traka na membranama, koje odgovaraju analiziranim proteinima, membrane su ispirane sa 5% BSA rastvora u TBST, sušene, a potom su signali kvantifikovani analizom jačine dobijenog signala, koji je proporcionalan nivou ekspresije ispitivanog proteina.

Postupak HRP metode izvođen je inkubiranjem membrana u ECL reagensu (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK i Pierce, Thermo Scientific, Waltham, SAD) u trajanju od jednog minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Membrane su, zatim, ceđene i postavljane u kasetu za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD), a preko njih je stavljan autoradiografski film (AGFA, Medical X-ray film, Belgija), pri čemu je vremenski period u kome je film bio izložen luminiscenciji varirao od 30 sekundi do 30 minuta, u zavisnosti od intenziteta dobijenog signala. Princip reakcije se zasniva na oksidaciji luminola uz pomoć peroksidaze, pri čemu nastaje intermedijarno jedinjenje koje emituje svetlost i na taj način osvetljava film.

U slučaju kada je na istoj membrani, pored fosforilisane forme proteina, trebalo detektovati i ukupnu formu ispitivanog proteina, kao i konstitutivno eksprimirani aktin, membrana je ispirana puferom za otklanjanje vezanih primarnih i sekundarnih antitela (*engl. stripping*). Postupak je izvođen tako što je membrana inkubirana na dva puta po pet minuta u puferu koji je sadržao 6M guanidin hidrohlorid (CH₆CIN₃), 0,2% deterdženta Triton X, 0,1 M β-mercaptoetanol, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5). Nakon toga membrana je ispirana tri puta po 10 minuta TBS-T puferomi potom su membrane blokirane i inkubirane sa specifičnim antitelima u cilju ispitivanja proteina od interesa.

Intenzitet signala dobijenog na membrani tokom ALP metode ili na filmu tokom ECL metode odgovara količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima i određivan je denzitometrijskom analizom korišćenjem računarskog programa Image J 1.45s (National Institutes of Health, SAD, <http://rsb.info.nih.gov>). Izmerene vrednosti za optičku gustinu signala proteina izražavane su kao arbitrarna jedinica (AJ) po μg proteina i predstavljane su u odnosu na vrednosti β -aktina, korišćenog kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka na gel (*engl. loading control*). Intenzitet signala, tj. nivo ekspresije proteina iz lizata limfocita i seruma po završetku HBK terapije, upoređivan je sa nivoom ekspresije proteina pre početka HBK terapije i prikazivan je kao % promene u odnosu na vrednosti pre početka terapije.

4.4.6. Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata

Dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije su prikazivani kao aritmetička sredina \pm standardna greška (*SEM, engl. Standard Error of Mean*) i/ ili kao % promene u odnosu na vrednosti pre terapije. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Od metoda analitičke statistike korišćeni su testovi za procenu značajnosti povezanosti i razlike. Značajnost razlika parametarskih podataka određivana je pomoću Studentovog *t*-testa. Povezanosti između dve željene varijable u celom uzorku, kao i nivoi značajnosti korelativnih odnosa određivani su pomoću Spermanovog koeficijenta korelacije - ρ u slučajevima neparametarskih, odnosno Pirsonovog koeficijenta - r u slučajevima gde su podaci sledili normalnu raspodelu. Statistički značajnom je smatrana verovatnoća manja od 0,05. Za statističku obradu podataka korišćen je program SPSS 18.0 (*engl. Statistical Package for the Social Sciences*).

5. Rezultati

Istraživanja ove doktorske disertacije bavila su se izučavanjem efekta terapije HBK na nivo i sastav MK u plazmi, regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS proteina u limfocitima, kao i na koncentraciju parametara metabolizma glukoze, lipida i markera inflamacije kod obolelih od IDDM. Takođe je izučavan i efekat terapije HBK na signalne molekule uključene u molekulski mehanizam delovanja insulina: IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 i NFκB, kao i njihove uloge u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM. Osim toga, kod istih pacijenata izučavan je i efekat terapije HBK na ekspresiju IGFBP-1 proteina.

U cilju boljeg razumevanja efekta terapije HBK na pacijente sa IDDM i vaskularnim komplikacijama korišćen je dizajn ponovljenog merenja na istoj grupi pacijenata, pri čemu su vrednosti analizanih parametara pacijenata upoređivane pre i posle terapije HBK.

5.1. Demografski podaci pacijenata sa IDDM

Ispitivanu grupu činilo je 28 pacijenata sa IDDM i perifernim vaskularnim komplikacijama, prosečne životne dobi $62,4 \pm 1,7$ (od 41 do 80 godina), od kojih je 7 osoba bilo ženskog pola (25%), dok je 21 osoba bila muškog pola (75%).

5.2. Antropometrijski i klinički parametri pacijenata sa IDDM

Prvi deo istraživanja u okviru ove doktorske disertacije odnosio se na merenja pojedinih antropometrijskih parametara ispitanika pre početka terapije HBK kao što su: telesna masa, telesna visina i BMI. Rezultati prikazani u **Tabeli 1.** pokazuju da je prosečna vrednost TM ispitanika bila $83,2 \pm 2$ kg, dok je prosečna vrednost TV ispitanika bila $1,75 \pm 0,02$ m. Na osnovu navedenih vrednosti TM i TV, izračunata je srednja vrednost BMI, koja je pokazatelj uhranjenosti ispitanika. Srednja vrednost BMI ispitanika iznosila je $27,4 \pm 0,8$ kg/m² (od 21,6 do 35,1 kg/m²), i ove dobijene vrednosti ukazuju da su pacijenti sa IDDM imali prekomernu telesnu masu tj. da su bili predgojazni (BMI između 25 i 29,9 kg/m²) (National Institutes of Health, 1998).

Tabela 1. Prikaz antropometrijskih parametara ispitanika pre početka terapije HBK

Parametar	Vrednost
Telesna masa [kg]	$83,2 \pm 2,0$
Telesna visina [m]	$1,75 \pm 0,02$
BMI [kg/m ²]	$27,4 \pm 0,8$

Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM.

Podaci o dužini trajanja DM, kao i postojanju HTA, dobijeni su iz zdravstvenih kartona ispitanika. Prosečno trajanje DM bilo je $16 \pm 1,8$ godina (u opsegu od 3 do 35 godina), dok je HTA zabeležena kod 20 od 28 ispitanika (71,4%). Dužina trajanja DM ≥ 10 godina, kao i prisustvo HTA predstavljaju bitne faktore koji ukazuju za razvoj vaskularnih komplikacija kod obolelih od IDDM (Zoungas i sar., 2014; Yamazaki i sar., 2018).

Iz medicinske dokumentacije i popunjenih upitnika od strane ispitanika dobijeni su podaci o dodatnim terapijama ispitanika. U **Tabeli 2.** prikazan je broj ispitanika koji su koristili antitrombocitnu, hipolipemijsku i antihipertenzivnu terapiju pre početka HBK. Od

antitrombocitne terapije kod pacijenata sa IDDM korišćeni su klopidogrel i acetilsalicilna kiselina. Lek klopidogrel inhibira formiranje krvnih ugrušaka i koristi se u lečenju koronarne arterijske bolesti, periferne vaskularne bolesti i cerebrovaskularne bolesti. Acetilsalicilna kiselina je lek koji se koristi protiv bolova, visoke temperature i inflamacije, a deluje i kao antikoagulans, te se koristi u sekundarnoj prevenciji infarkta miokarda. Statini i fibrati su korišćeni u svrhu hipolipemijske terapije pacijenata sa IDDM, jer imaju ulogu u regulaciji lipidnog statusa, a takođe poboljšavaju toleranciju na glukozu i smanjuju inflamaciju. U okviru antihipertenzivne terapije korišćeni su inhibitori enzima koji konvertuju angiotenzin, blokatori receptora za angiotenzin, blokatori kalcijumskih kanala, blokatori β -kateholaminskih receptora i kombinacija antihipertenziva u cilju snižavanja HTA, kao i smanjenja rizika za nastanak KVB.

Tabela 2. Prikaz udela ispitanika po antitrombocitnoj, hipolipemijskoj i antihipertenzivnoj terapiji pre početka terapije HBK

Vrsta terapije	Medikament	n
Antitrombocitna terapija	<i>Klopidogrel</i>	3 (11%)
	<i>Acetilsalicilna kiselina</i>	19 (68%)
Hipolipemijska terapija	<i>Statini</i>	14 (50%)
	<i>Fibrati</i>	2 (7%)
Antihipertenzivna terapija	<i>Inhibitori enzima koji konvertuju angiotenzin, blokatori receptora za angiotenzin, blokatori kalcijumskih kanala, blokatori β-kateholaminskih receptora i kombinacija antihipertenziva</i>	20 (71%)

Podaci u tabeli su prikazani kao % broja ispitanika (n) prema određenoj terapiji u odnosu na ispitivanu grupu.

5.3. Hematološki parametri pacijenata sa IDDM

U Tabeli 3. prikazani su rezultati hematoloških analiza obolelih od IDDM pre početka terapije HBK. Prikazani rezultati su pokazali da se vrednosti svih hematoloških parametara ispitanika nalaze u opsegu referentnih vrednosti.

Tabela 3. Prikaz hematoloških parametara ispitanika pre početka terapije

Parametar	Vrednost	Referentna vrednost
Leukociti [$\times 10^9/l$]	$8,5 \pm 0,4$	3,5 - 10,5
Eritrociti [$\times 10^{12}/l$]	$4,7 \pm 0,1$	3,9 - 5,7
Trombociti [$\times 10^9/l$]	$268 \pm 18,4$	150 - 450
Hemoglobin [g/l]	$133 \pm 2,8$	120 - 175
Hematokrit [%]	$39,4 \pm 0,8$	35 - 50

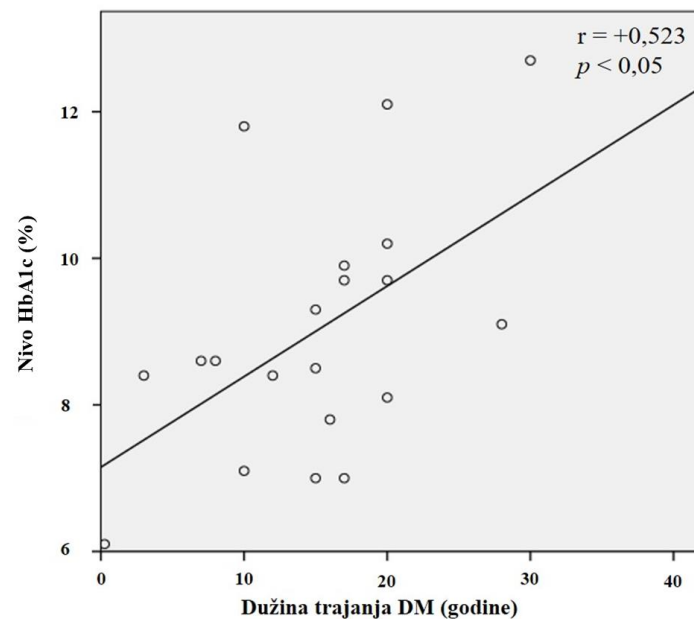
Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM.

5.4. Parametri metabolizma glukoze u krvi pacijenata sa IDDM

Imajući u vidu da osnovu oboljenja DM čini poremećaj u sekreciji insulina i metabolizmu glukoze, u daljem radu su mereni nivo HbA1c u uzorcima krvi pre početka terapije HBK, kao i glikemija i koncentracija insulina u uzorcima seruma pacijenata sa IDDM pre i nakon izlaganja HBK.

5.4.1. Nivo HbA1c u krvi pacijenata sa IDDM

Prema preporuci WHO, izmereni nivo HbA1c u krvi $\geq 6,5\%$ ukazuje na postojanje DM, a kod dugogodišnjih pacijenata sa DM ukazuje na neadekvatnu kontrolu glikemije (Sherwani i sar., 2016). Merenja su pokazala da je prosečni nivo HbA1c u krvi ispitanika iznosio $8,6 \pm 0,1\%$. Na **Slici 1.** predstavljeni su rezultati dobijeni nakon linearne regresione analize ispitivanih parametara, koja ukazuje na postojanje pozitivne korelacije između nivoa HbA1c u krvi i dužine trajanja DM kod ispitanika pre početka terapije HBK ($r = +0,523$; $p < 0,05$).

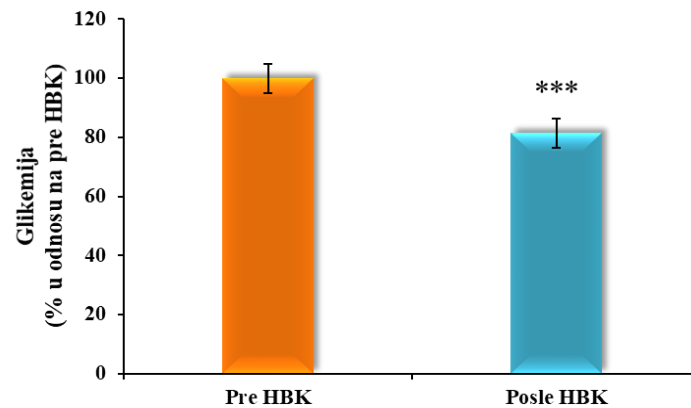


Slika 1. Prikaz korelacije između nivoa HbA1c u krvi i dužine trajanja DM kod ispitanika pre početka terapije HBK

Nivo HbA1c u krvi prikazan je kao % u odnosu na koncentraciju ukupnog Hb u krvi, a dužina trajanja DM prikazana je u godinama. (rezultati su predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM) (n=19) *Pearson test

5.4.2. Uticaj terapije HBK na glikemiju pacijenata sa IDDM

Polazeći od činjenice da se glikemija preko 7 mmol/l smatra hiperglikemijom, i da ona predstavlja jedan od glavnih faktora rizika za razvoj vaskularnih komplikacija kod obolelih od IDDM (Nathan i sar., 1993), sledeća ispitivanja koja su sprovedena bila su usmerena na merenje glikemije nakon dvanaestočasovnog gladovanja ispitanika pre i nakon izlaganja HBK. Na **Slici 2.** su prikazani rezultati merenja jutarnje preprandijalne glikemije i oni pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja glikemije u krvi za 20% ($p < 0,001$) u odnosu na izmerene vrednosti pre početka primene terapije HBK (pre HBK: $9,4 \pm 0,7$ mmol/l; posle HBK: $7,3 \pm 0,6$ mmol/l).

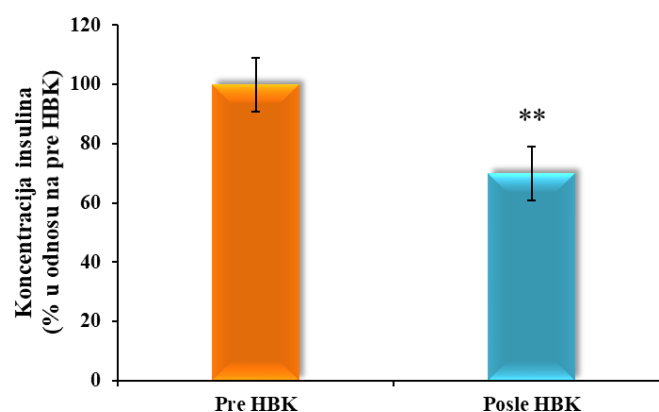


Slika 2. Uticaj terapije HBK na preprandijalnu glikemiju u krvi pacijenata sa IDDM

Rezultati jutarnje preprandijalne glikemije prikazani su kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. (n=17) *** $p < 0,001$.

5.4.3. Uticaj terapije HBK na koncentraciju insulina u serumu pacijenata sa IDDM

Rezultati dobijeni merenjem koncentracije insulina u serumu ispitanika pre i posle terapije HBK, ukazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije insulina za 30% ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti izmerene pre terapije (pre HBK: $37,1 \pm 5,6$ mlU/l; posle HBK: $21,9 \pm 3,8$ mlU/l) (Slika 3.).



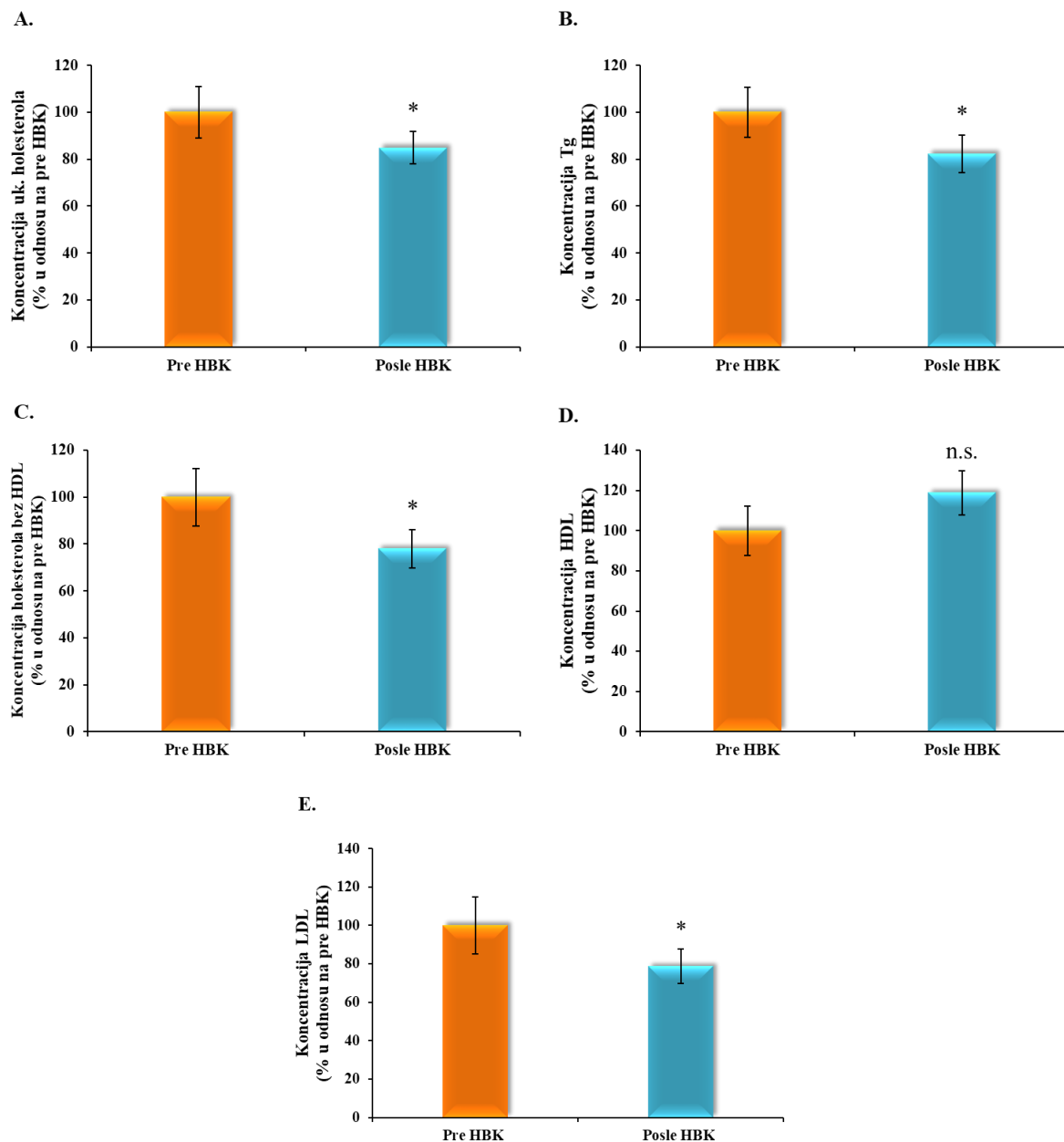
Slika 3. Uticaj terapije HBK na koncentraciju insulina u serumu pacijenata sa IDDM

Rezultati koncentracije insulina u serumu prikazani su kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. (n=16) ** $p < 0,01$.

5.5. Uticaj terapije HBK na parametre lipidnog statusa pacijenata sa IDDM

Polazeći od toga da u metaboličkim poremećajima, poput DM, često dolazi do poremećaja metabolizma lipida (Guy i sar., 2009), u daljem radu su određivane koncentracije komponenti lipidograma: ukupni holesterol, Tg, HDL, holesterol bez HDL i LDL u plazmi ispitanika (**Slika 4.**), na osnovu kojih je procenjivan nivo rizika za nastanak ateroskleroze i KVB (**Slika 5.**). Nakon terapije HBK kod ispitanika je uočeno :

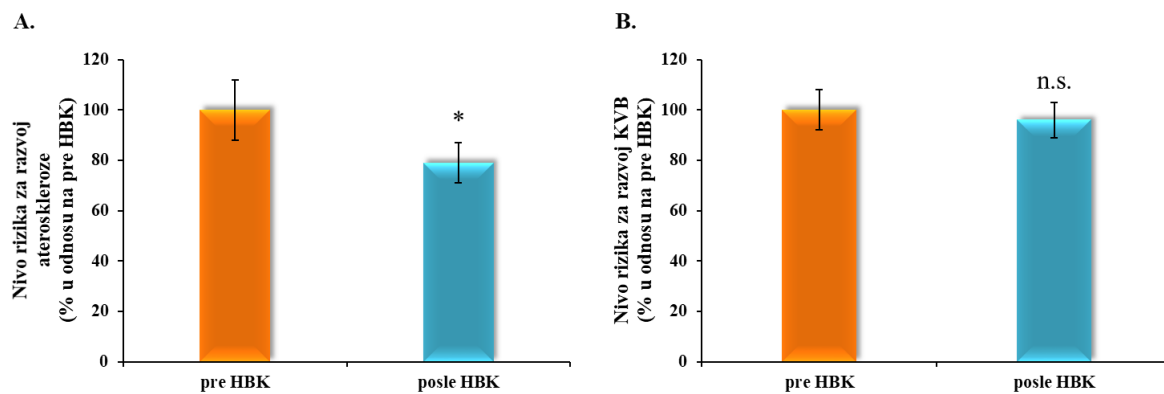
- statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnog holesterola za 15% ($p < 0,05$) (pre HBK: 1 – 5,7 mmol/l; posle HBK: 0,7 – 2,5 mmol/l) (**Slika 4A.**),
- statistički značajno smanjenje koncentracije Tg za 18% ($p < 0,05$) (pre HBK: 0,3 – 1,9 mmol/l; posle HBK: 0,2 – 1,2 mmol/l) (**Slika 4B.**),
- statistički značajno smanjenje koncentracije holesterola bez HDL za 22% ($p < 0,05$) (pre HBK: 0,5 – 4,2 mmol/l; posle HBK: 0,4 – 2,0 mmol/l) (**Slika 4C.**),
- statistički neznačajno povećanje koncentracije HDL (pre HBK: 0,2 – 0,9 mmol/l; posle HBK: 0,2 – 1,0 mmol/l) (**Slika 4D.**),
- statistički značajno smanjenje koncentracije LDL za 21% ($p < 0,05$) (pre HBK: 0,4 – 3,6 mmol/l; posle HBK: 0,2 – 1,5 mmol/l) (**Slika 4E.**).



Slika 4. Uticaj terapije HBK na parametre lipidnog statusa pacijenata sa IDDM

A. Koncentracija ukupnog holesterola u plazmi; **B.** Koncentracija Tg u plazmi; **C.** Koncentracija holesterola bez HDL u plazmi; **D.** Koncentracija HDL u plazmi; **E.** Koncentracija LDL u plazmi. (n=19) * $p < 0,05$; n.s.- nema statističke značajnosti; Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM.

Izračunavanjem rizika za nastanak ateroskleroze i KVB pokazano je značajno smanjenje nivoa rizika za nastanak ateroskleroze za 21% (posle HBK: $79 \pm 8\%$, $p < 0,05$) u odnosu na izračunate vrednosti pre terapije HBK (**Slika 5A.**), uz izostanak promene nivoa rizika za nastanak KVB u odnosu na dobijene vrednosti pre terapije HBK (posle HBK: $96 \pm 7\%$, *n.s.*) (**Slika 5B.**).

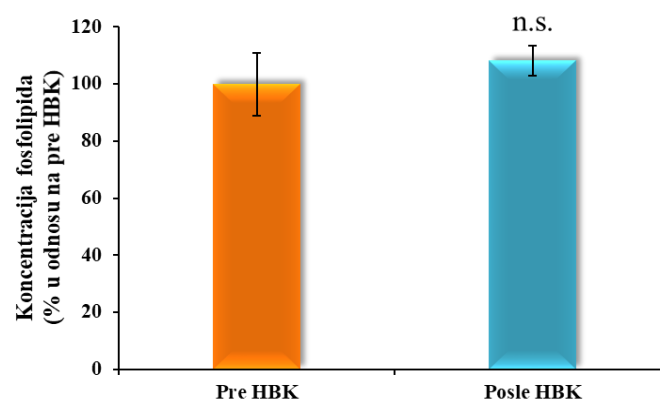


Slika 5. Uticaj terapije HBK na nivo rizika nastanka ateroskleroze i KVB kod pacijenata sa *IDDM*

A. Nivo rizika za nastanak ateroskleroze kod obolelih od *IDDM*; **B.** Nivo rizika za nastanak KVB kod obolelih od *IDDM*. ($n=19$) * $p < 0,05$; *n.s.* - nema statističke značajnosti. Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM.

5.6. Uticaj terapije HBK na koncentraciju fosfolipida i SMK u plazmi pacijenata sa IDDM

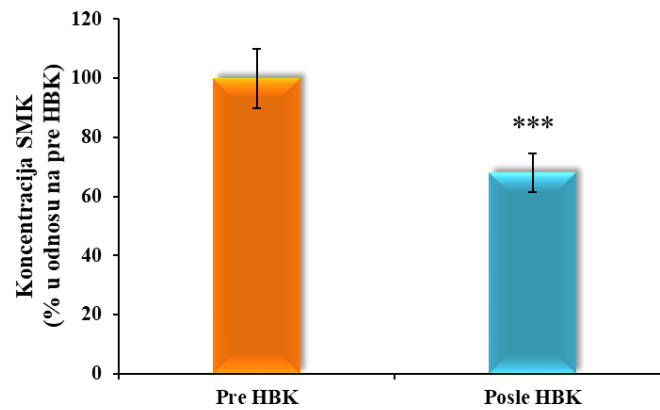
Imajući u vidu da je poremećaj u metabolizmu fosfolipida i SMK povezan sa poremećajem u regulaciji glikemije, i da zajedno povećavaju rizik za nastanak DM i vaskularnih komplikacija (Boden, 2003; Chang i sar., 2019), u sledećim eksperimentima je određivana koncentracija fosfolipida i SMK u plazmi ispitanika pre početka i posle završene terapije HBK (Slike 6. i 7.). Rezultati pokazuju da terapija HBK nije dovela do statistički značajne promene koncentracije fosfolipida u odnosu na vrednosti pre terapije HBK (pre HBK: $0,4 \pm 0,04$ mmol/l; posle HBK: $0,4 \pm 0,03$ mmol/l).



Slika 6. Uticaj terapije HBK na koncentraciju fosfolipida u plazmi pacijenata sa IDDM

Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. ($n=16$) n.s.- nema statističke značajnosti.

Dobijeni rezultati pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije SMK za 32% ($p<0,001$) (Slika 7.) u odnosu na vrednosti izmerene pre terapije (pre HBK: $0,6 \pm 0,1$ mmol/l; posle HBK: $0,4 \pm 0,1$ mmol/l).



Slika 7. Uticaj terapije HBK na koncentraciju SMK u plazmi pacijenata sa IDDM

Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljani kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. ($n=17$) *** $p<0,001$.

5.7. Uticaj terapije HBK na nivo MK u plazmi pacijenata sa IDDM

Polazeći od literaturnih podataka da MK imaju ulogu u regulaciji transporta molekula kroz membranu, interakciji sa membranskim proteinima, signalnim molekulima i faktorima transkripcije (Costabile i sar., 2005), u daljem radu je meren nivo ukupnih i pojedinačnih MK u plazmi ispitanika pre početka i po završetku terapije HBK.

U **Tabeli 4.** prikazani su rezultati merenja nivoa određenih MK u plazmi ispitanika. Dobijeni rezultati pokazuju da terapija HBK nije imala statistički značajnog uticaja na nivo ukupnih SFA, MUFA i PUFA u plazmi. Međutim, uočeno je da je nakon terapije HBK došlo do statistički značajnog povećanja nivoa pojedinačnih MK: palmitinske kiseline - SFA ($p<0,05$), palmitoleinske kiseline ($p<0,05$)- MUFA, dokozaheksaenoinske kiseline - n-3 PUFA ($p<0,05$), dokozaheksaenoinske kiseline - n-3 PUFA ($p<0,01$), kao i smanjenja nivoa stearinske kiseline - SFA ($p<0,05$), α -linoleinske kiseline - n-3 PUFA ($p<0,05$) i linolne kiseline - n-6 PUFA ($p<0,01$) u plazmi ispitanika.

Tabela 4. Uticaj terapije HBK na nivo ukupnih i pojedinačnih MK u plazmi pacijenata sa IDDM

Masne kiseline	Pre HBK [%]	Posle HBK [%]	<i>p</i>
SFA	40,6 ± 0,3	40,3 ± 0,4	<i>n.s.</i>
Palmitinska kiselina, 16:0	27,1 ± 0,3	28,1 ± 0,3	<0,05
Stearinska kiselina, 18:0	13,3 ± 0,2	12,4 ± 0,2	<0,05
MUFA	16,7 ± 0,4	17,0 ± 0,5	<i>n.s.</i>
Palmitoleinska kiselina, 16:1	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	<0,05
Vakcenska kiselina, 18:1(n-7)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	<i>n.s.</i>
Oleinska kiselina, 18:1(n-9)	13,4 ± 0,4	14,2 ± 0,4	<i>n.s.</i>
n-3 PUFA	3,5 ± 0,2	3,8 ± 0,1	<i>n.s.</i>
α-linoleinska kiselina, 18:3(n-3)	0,3 ± 0,04	0,2 ± 0,02	<0,05
Eikozapentaenoinska kiselina, 20:5(n-3)	0,5 ± 0,05	0,5 ± 0,04	<i>n.s.</i>
Dokozapentaenoinska kiselina, 22:5(n-3)	0,5 ± 0,02	0,6 ± 0,03	<0,05
Dokozaheksaenoinska kiselina, 22:6(n-3)	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	<0,01
n-6 PUFA	39 ± 2,1	38,7 ± 2,1	<i>n.s.</i>
Linolna kiselina, 18:2(n-6)	25,3 ± 0,04	23,2 ± 0,04	<0,01
γ-linolna kiselina, 18:3(n-6)	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,01	<i>n.s.</i>
Dihomo-γ-linolna kiselina, 20:3(n-6)	2,9 ± 0,3	3,3 ± 0,2	<i>n.s.</i>
Arahidonska kiselina, 20:4(n-6)	10,5 ± 0,4	10,5 ± 0,3	<i>n.s.</i>
Adreninska kiselina, 22:4(n-6)	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,02	<i>n.s.</i>

Dobijeni rezultati su prikazani u vidu % udela pojedinačnih MK u odnosu na ukupne MK plazme u poređenju sa vrednostima pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost ± SEM (n=17-19).

U **Tabeli 5.** prikazani su rezultati dobijeni Pirsonovim testom nakon linearne regresione analize nivoa pojedinačnih MK u plazmi, kliničkih i biohemijskih parametara ispitanika pre početka HBK terapije, između kojih je postojala statistički značajna korelacija. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje statistički značajne negativne korelacije između nivoa palmitoleinske kiseline u plazmi i dužine trajanja DM ($r = -0,574$; $p < 0,05$), kao i postojanje statistički značajne negativne korelacije između nivoa palmitoleinske kiseline u plazmi i nivoa HbA1c u krvi ispitanika ($r = -0,486$; $p < 0,05$).

Tabela 5. Prikaz rezultata linearne regresione analize nivoa palmitoleinske kiseline u plazmi, dužine trajanja DM i nivoa HbA1c u krvi pre početka HBK terapije

Parametri		Koeficijent korelacije - r	p
Nivo palmitoleinske kiseline (%)	Trajanje DM (godine)	-0,574	<0,05
	Nivo HbA1c (%)	-0,486	<0,05

U daljem radu eksperimenti su obuhvatili i merenje aktivnosti enzima koji su uključeni u elongaciju i desaturaciju MK elongaze i desaturaza $\Delta 5$, $\Delta 6$ i $\Delta 9$ u plazmi ispitanika pre i posle terapije HBK (**Tabela 6.**). Aktivnosti ovih enzima dobijene su izračunavanjem odnosa udela pojedinačnih MK u odnosu na ukupne MK u plazmi. Dobijeni rezultati pokazuju da je u plazmi ispitanika nakon terapije HBK došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti elongaze ($p < 0,01$) i $\Delta 5$ desaturaze ($p < 0,05$), kao i do povećanja aktivnosti $\Delta 9$ desaturaze ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima dobijenim pre početka terapije. Rezultati određivanja aktivnosti $\Delta 6$ desaturaze pokazuju da aktivnost ovog enzima nije promenjena u plazmi ispitanika nakon izlaganja HBK.

Tabela 6. Uticaj terapije HBK na aktivnost elongaze i desaturaza MK ispitanika

Parametar	Formula	Pre HBK	Posle HBK	<i>p</i>
Elongaza MK	18:0 + 18:1(n-9) / 16:0	0,5 ± 0,01	0,4 ± 0,01	<0,01
Δ5 desaturaza	20:4(n-6) / 20:3(n-6)	4,1 ± 0,04	3,1 ± 0,02	<0,05
Δ6 desaturaza	18:3(n-6) / 18:2(n-6)	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003	<i>n.s.</i>
Δ9 desaturaza	16:1 / PA, 16:0	1 ± 0,05	1,1 ± 0,06	<0,05

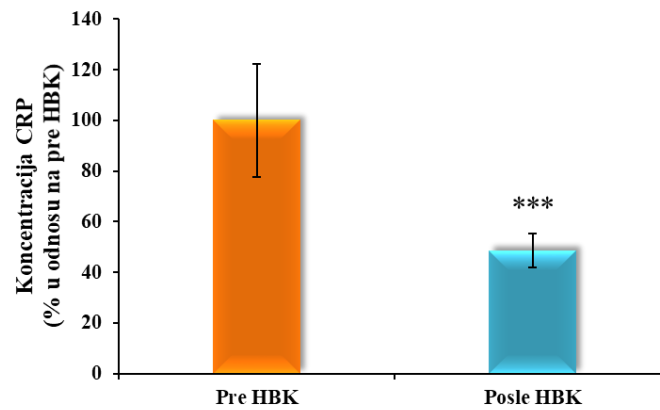
Rezultati su predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost ± SEM aktivnosti enzima elongaze i desaturaza MK (*n*=13-17).

5.8. Uticaj terapije HBK na koncentraciju markera inflamacije u krvi pacijenata sa IDDM

Uzimajući u obzir literaturne podatke koji su nedvosmisleno ukazali na prisustvo inflamacije u stanju DM, (Kang i sar., 2005), u daljem radu je iz krvi ispitanika pre i nakon završetka terapije HBK, merena koncentracija pojedinih markera inflamacije kao što su CRP, Hcy i NO.

5.8.1. Uticaj terapije HBK na koncentraciju CRP u serumu pacijenata sa IDDM

Rezultati prikazani na **Slici 8.** pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije CRP u serumu ispitanika za 51% ($p < 0,001$) u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK (pre HBK: $8,9 \pm 2,0$ mg/l; posle HBK: $3,9 \pm 1,2$ mg/l).

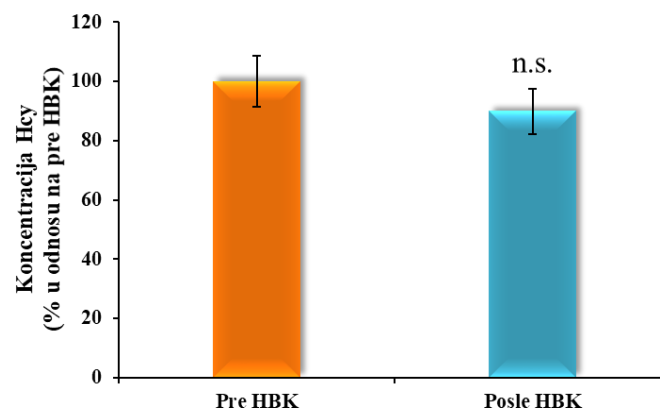


Slika 8. Uticaj terapije HBK na koncentraciju CRP u serumu pacijenata sa IDDM

Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. (n=22) *** $p < 0,001$.

5.8.2. Koncentracija Hcy u plazmi ispitanika pre i posle terapije HBK

U daljem radu merena je koncentracija Hcy u plazmi ispitanika pre i posle terapije HBK. Rezultati pokazuju da je koncentracija Hcy u krvi pacijenata sa IDDM bila povišena i pre HBK (pre HBK: $15,5 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$; posle HBK: $13,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$) (Slika 9.), što ukazuje na stanje HHcy.

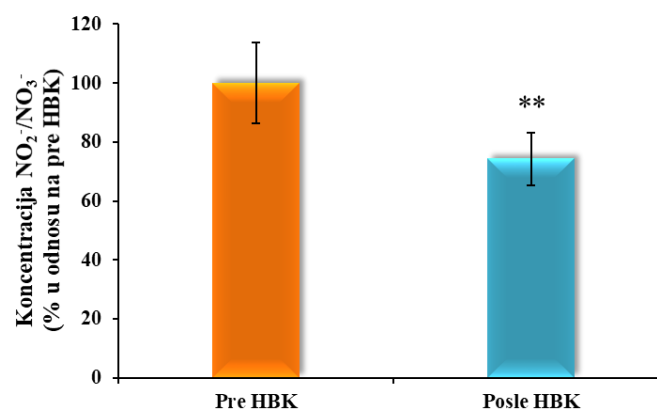


Slika 9. Uticaj terapije HBK na koncentraciju Hcy u plazmi pacijenata sa IDDM

Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. (n=15) n.s.- nema statističke značajnosti.

5.8.3. Uticaj terapije HBK na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u serumu pacijenata sa IDDM

Na **Slici 10.** prikazani su rezultati merenja koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, kao krajnjih stabilnih metabolita oksidacije NO, koji pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u serumu za 36% ($p < 0,01$) u odnosu na izmerene vrednosti pre terapije (pre HBK: $148,7 \pm 20,4 \mu\text{mol/l}$; posle HBK: $115,7 \pm 25 \mu\text{mol/l}$).

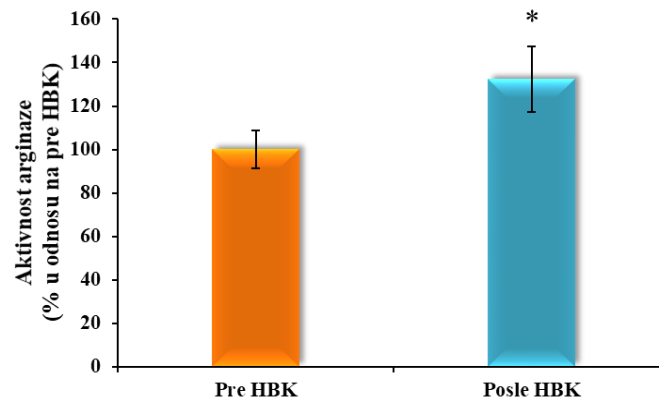


Slika 10. Uticaj terapije HBK na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u serumu pacijenata sa IDDM

Rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljani kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. ($n=12$) ** $p < 0,01$.

5.9. Uticaj terapije HBK na aktivnost arginaze u serumu pacijenata sa IDDM

Dobijeni rezultati merenja aktivnosti arginaze, enzima koji učestvuje u hidrolizi L-arginina u L-ornitin i ureu, i koji se nalazi u kompeticiji za isti supstrat (L-arginin) sa NOS, pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog povećanja aktivnosti ovog enzima u serumu za 32% ($p < 0,05$) u odnosu na vrednosti pre terapije HBK (Pre HBK: $0,18 \pm 0,02$; posle HBK: $0,24 \pm 0,03$) (**Slika 11.**).



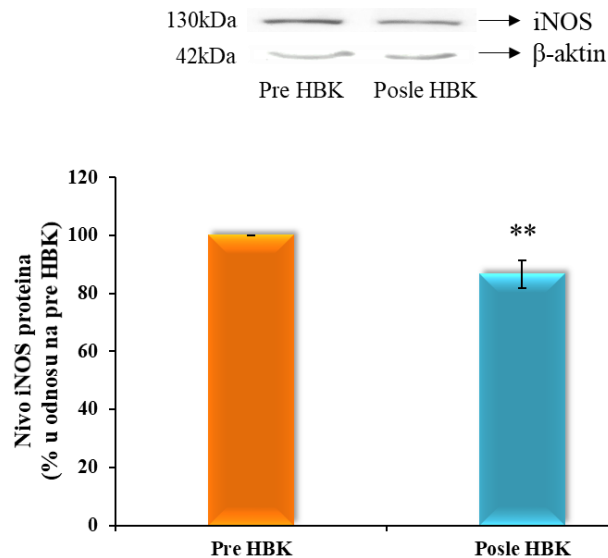
Slika 11. Uticaj terapije HBK na aktivnost arginaze u serumu pacijenata sa IDDM

Dobijeni rezultati su prikazani kao % u odnosu na vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. ($n=12$) * $p<0,05$.

5.10. Uticaj terapije HBK na ekspresiju iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM

Jedan od postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije je bilo i izučavanje efekta terapije HBK na regulaciju ekspresije iNOS u limfocitima ispitanika, stoga je merena ekspresija iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM, kao i regulacija ekspresije i aktivnosti ovog enzima u limfocitima pacijenata sa IDDM.

Na **Slici 12.** prikazani su rezultati efekta terapije HBK na ekspresiju iNOS u lizatima limfocita ispitanika. Dobijeni rezultati pokazuju da je terapija HBK dovela do smanjenja nivoa iNOS za 13% u lizatima limfocita u poređenju sa dobijenim vrednostima pre terapije HBK (posle HBK = $87 \pm 5\%$, $p<0,01$).



Slika 12. Uticaj terapije HBK na ekspresiju iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM

Rezultati nivoa iNOS proteina u limfocitima izraženi su kao % u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. ($n=13$) ** $p < 0,01$.

Rezultati dobijeni Pirsonovim testom linearne regresione analize nivoa iNOS u lizatima limfocita, pojedinačnih MK u plazmi i biohemijskih parametara u krvi ispitanika, između kojih je postojala statistički značajna korelacija pre i posle HBK terapije, prikazani su u **Tabeli 7**. Dobijeni rezultati su pokazali da postoji pozitivna korelacija između nivoa iNOS u limfocitima i nivoa HbA1c u krvi ($r = +0,758$; $p < 0,01$), kao i da postoji negativna korelacija između količine iNOS u lizatima limfocita i nivoa palmitoleinske kiseline u plazmi ispitanika pre terapije HBK ($r = -0,671$; $p < 0,05$). Rezultati dobijeni posle 10 tretmana terapije HBK su pokazali da postoji pozitivna korelacija između nivoa iNOS proteina u lizatima limfocita i koncentracije Tg u plazmi ispitanika ($r = +0,752$; $p < 0,01$).

Tabela 7. Prikaz rezultata linearne regresione analize nivoa iNOS u limfocitima, HbA1c u krvi, palmitoleinske kiseline i Tg u plazmi ispitanika pre i posle terapije HBK

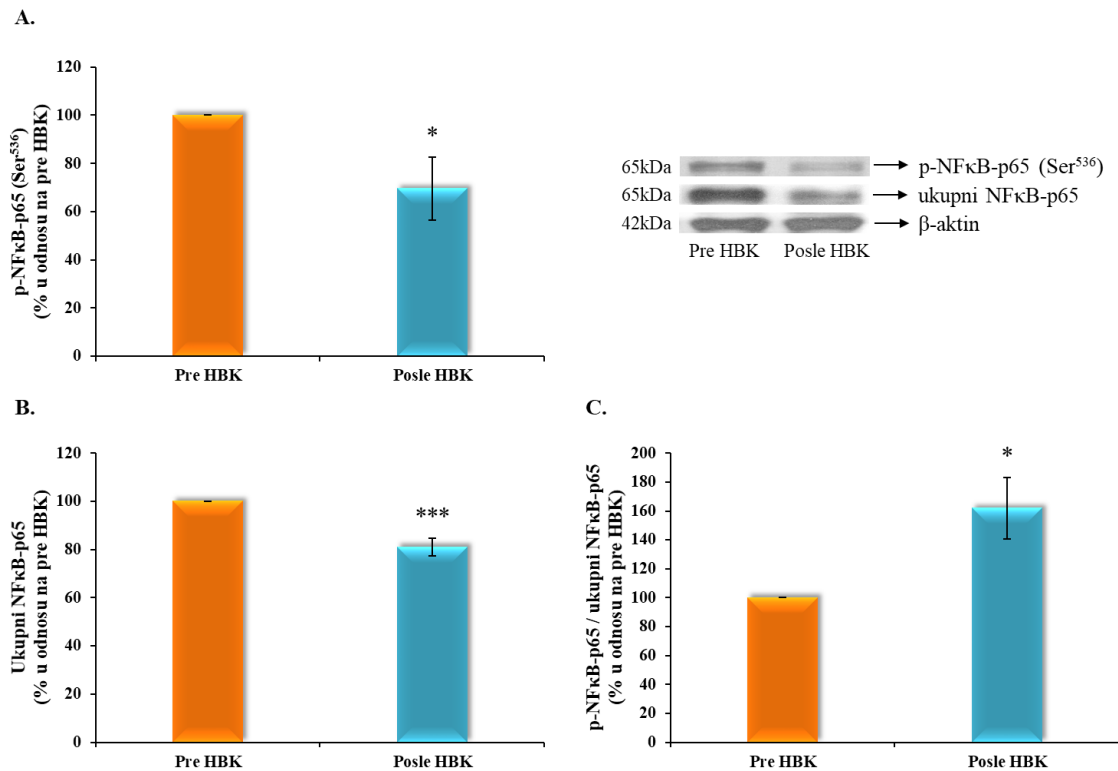
Parametri		Koeficijent korelacije - r	p
Nivo iNOS (%) pre HBK	Nivo HbA1c (%) pre HBK	+0,758	<0,01
	Nivo palmitoleinske kiseline (%) pre HBK	-0,671	<0,05
Nivo iNOS (%) posle HBK	Koncentracija Tg (mmol/l) posle HBK	+0,752	<0,01

5.11. Uticaj terapije HBK na nivo signalnih molekula uključenih u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM

Signalni molekuli, kao što su: IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 i NFκB, uključeni su u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u različitim ćelijama (Creager Mark i sar., 2003; Soskić i sar., 2011; Adela i sar., 2015), stoga je u daljem radu izučavan efekat terapije HBK na nivo fosforilacije i ekspresiju ovih signalnih molekula u limfocitima pacijenata sa IDDM.

5.11.1. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju NFκB-p65 transkripcionog faktora u limfocitima pacijenata sa IDDM

Rezultati ispitivanja efekta terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju NFκB-p65 na Ser⁵³⁶, jednog od transkripcionih faktora regulacije ekspresije iNOS proteina (Negi i sar., 2011), prikazani su na **Slici 15**. Merena je ekspresija fosforilisanog NFκB-p65 na Ser⁵³⁶ i ukupnog NFκB-p65, i određivan je njihov odnos. Dobijeni rezultati pokazuju da je u limfocitima pacijenata sa IDDM po završetku terapije došlo do smanjenja nivoa fosforilisanog NFκB-p65 na Ser⁵³⁶ za 30% (posle HBK = $70 \pm 13\%$, $p < 0,05$) (**Slika 15A.**), kao i smanjenja nivoa ukupnog NFκB-p65 za 19% (posle HBK = $81 \pm 4\%$, $p < 0,001$) u poređenju sa izmerenim vrednostima pre terapije HBK (**Slika 15B.**). Rezultati merenja odnosa fosforilisanog i ukupnog NFκB-p65, pokazuju da je terapija HBK u trajanju od 10 dana, dovela do statistički značajnog povećanja njihovog odnosa tj. fosforilacije NFκB-p65 na Ser⁵³⁶ za 62% (posle HBK = $162 \pm 21\%$, $p < 0,05$) u poređenju sa dobijenim vrednostima pre terapije HBK (**Slika 15C.**)

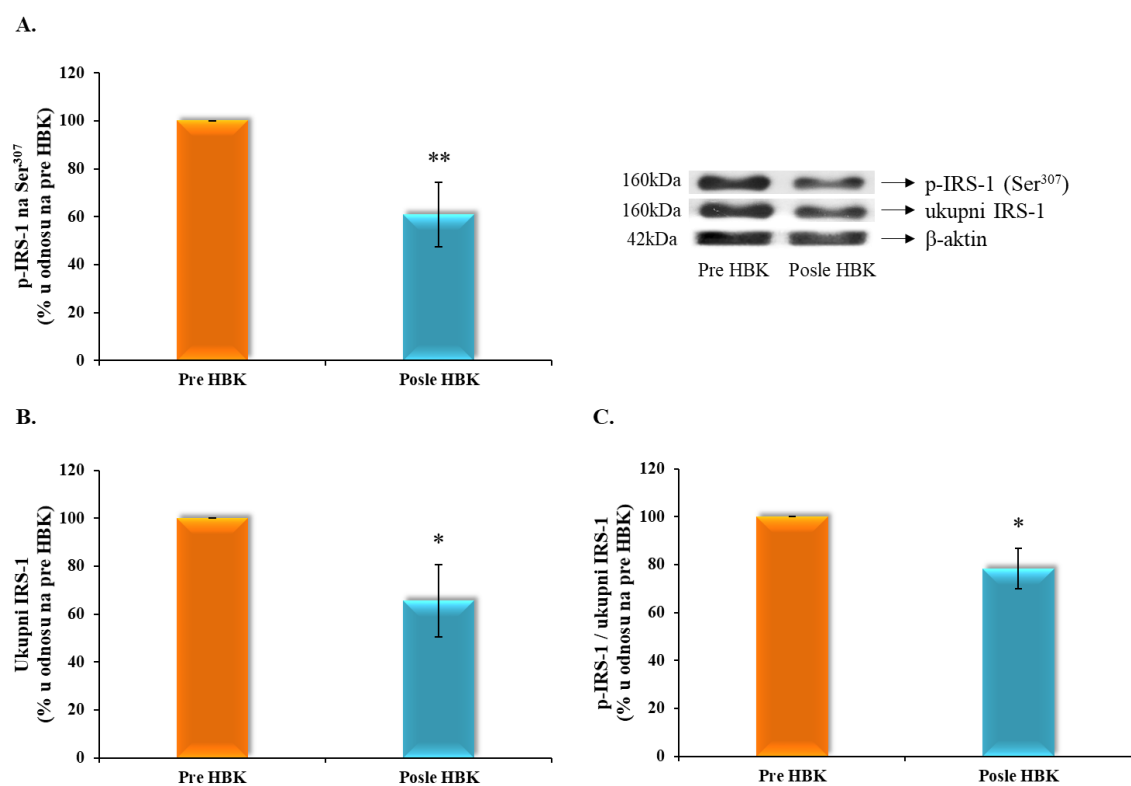


Slika 15. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju transkripcionog faktora NFκB-p65 na Ser⁵³⁶ u limfocitima pacijenata sa IDDM

A. Nivo fosforilisanog NFκB-p65 na Ser⁵³⁶ (p-NFκB-p65 Ser⁵³⁶); **B.** Nivo ekspresije ukupnog NFκB-p65; **C.** Odnos fosforilisanog NFκB-p65 na Ser⁵³⁶ i ukupnog NFκB-p65. (n=3-10) *** p<0,001; * p<0,05. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK i predstavljeni si kao srednja aritmetička vrednost ± SEM.

5.11.2. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju IRS-1 u limfocitima pacijenata sa IDDM

Na **Slici 16.** prikazani su rezultati dobijeni merenjem ekspresije fosforilisanog IRS-1 na Ser³⁰⁷ i ukupnog IRS-1, kao i izračunavanjem njihovog odnosa. Rezultati pokazuju da je nakon terapije HBK došlo do smanjenja nivoa fosforilisanog IRS-1 na Ser³⁰⁷ za 39% (posle HBK = 61 ± 13%, $p < 0,01$) (**Slika 16A.**), nivoa ukupnog IRS-1 za 34% (posle HBK = 66 ± 15%, $p < 0,05$) (**Slika 16B.**), kao i njihovog odnosa za 22% (posle HBK = 78 ± 8%, $p < 0,05$) (**Slika 16C.**) u limfocitima pacijenata.

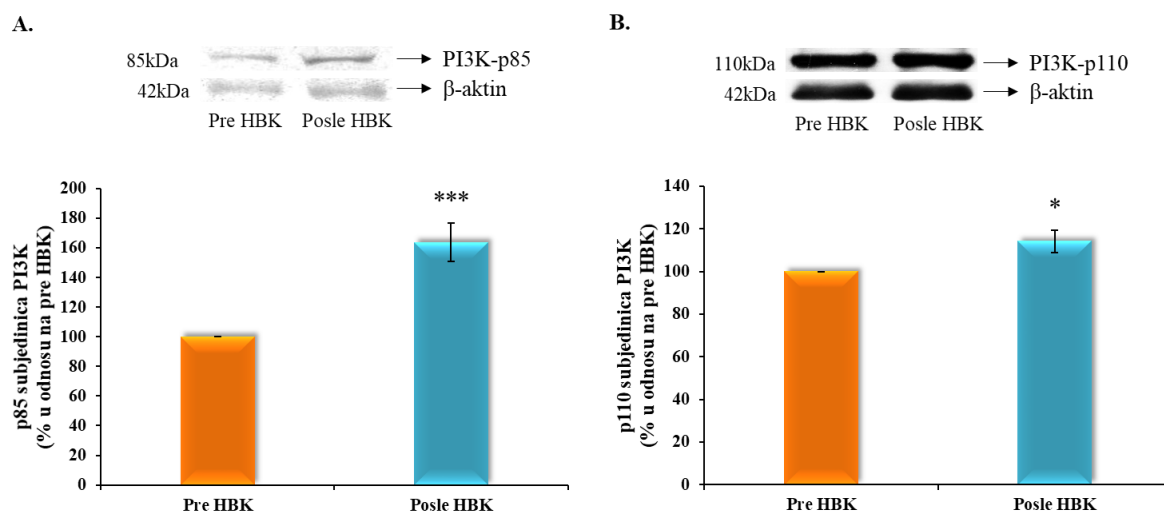


Slika 16. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju IRS-1 na Ser³⁰⁷, molekula signalnog puta insulina u limfocitima pacijenata sa IDDM

A. Nivo fosforilisanog IRS-1 na Ser³⁰⁷ (p-IRS-1 Ser³⁰⁷); **B.** Nivo ekspresije ukupnog IRS-1; **C.** Odnos fosforilisanog IRS-1 na Ser³⁰⁷ i ukupnog IRS-1. (n=6) ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na dobijene vrednosti pre terapije HBK i predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM.

5.11.3. Uticaj terapije HBK na ekspresiju subjedinic p85 i p110 PI3K u limfocitima pacijenata sa IDDM

Poznato je da poremećena aktivnost PI3K u različitim ćelijama obolelih od DM (Korkmaz-Icöz i sar., 2017) vodi procesu inflamacije i apoptoze (So i Fruman, 2012). Stoga je u daljem radu analizirana ekspresija regulatorne p85 α i katalitičke subjediniice p110 α PI3K u limfocitima ispitanika pre i posle terapije HBK (Slika 17). Kako se na Slici 17A. može videti u limfocitima ispitanika nakon terapije HBK došlo je do povećanja ekspresije regulatorne subjediniice p85 α PI3K za 64% (posle HBK = $164 \pm 13\%$, $p < 0,001$) i katalitičke subjediniice p110 α PI3K za 14% u poređenju sa dobijenim vrednostima pre terapije HBK (posle HBK = $114 \pm 5\%$, $p < 0,05$) (Slika 17B.).



Slika 17. Uticaj terapije HBK na ekspresiju PI3K u limfocitima pacijenata sa IDDM

A. Nivo ekspresije subjediniice p85 PI3K; **B.** Nivo ekspresije subjediniice p110 PI3K. ($n=6-7$) *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK i predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM.

Rezultati dobijeni Pirsonovim testom linearne regresione analize količine PI3K u lizatima limfocita i nivoa pojedinačnih MK u plazmi ispitanika, između kojih je postojala statistički značajna korelacija pre i posle HBK terapije prikazani su u Tabeli 8. Dobijeni rezultati pre početka terapije HBK su pokazali da postoji pozitivna korelacija između količine PI3K-p110 u lizatima limfocita i nivoa eikozapentaenoinske kiseline u plazmi ispitanika ($r =$

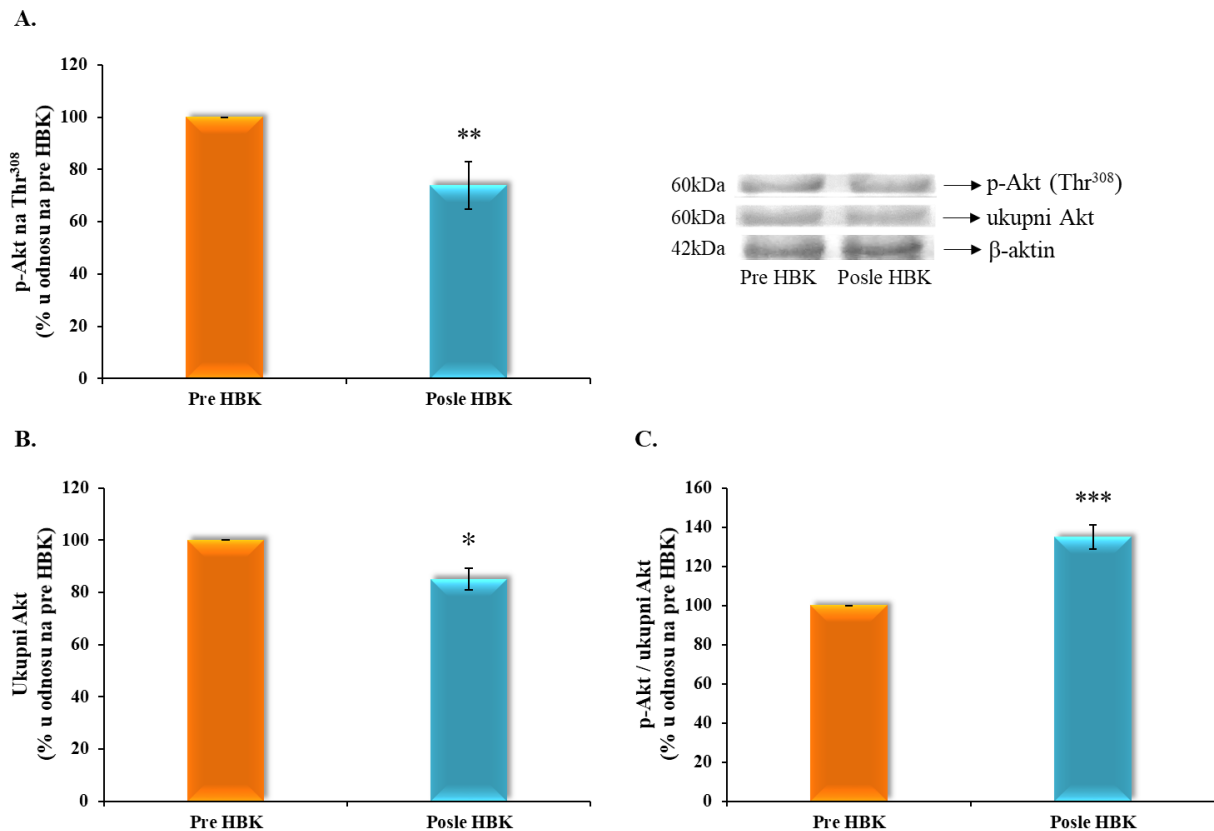
+0,953; $p < 0,05$), kao i između količine PI3K-p85 u lizatima limfocita i nivoa dokozapentaenoinske kiseline u plazmi ispitanika nakon terapije HBK ($r = +1$; $p < 0,001$).

Tabela 8. Prikaz rezultata linearne regresione analize nivoa PI3K u limfocitima i pojedinačnih MK u plazmi pacijenata sa IDDM pre i posle terapije HBK

Parametri		Koeficijent korelacije - r	p
Nivo PI3K-p110 (%) pre HBK	Nivo eikozapentaenoinske kiseline (%) pre HBK	+0,953	<0,05
Nivo PI3K-p85 (%) posle HBK	Nivo dokozapentaenoinske kiseline (%) posle HBK	+1	<0,001

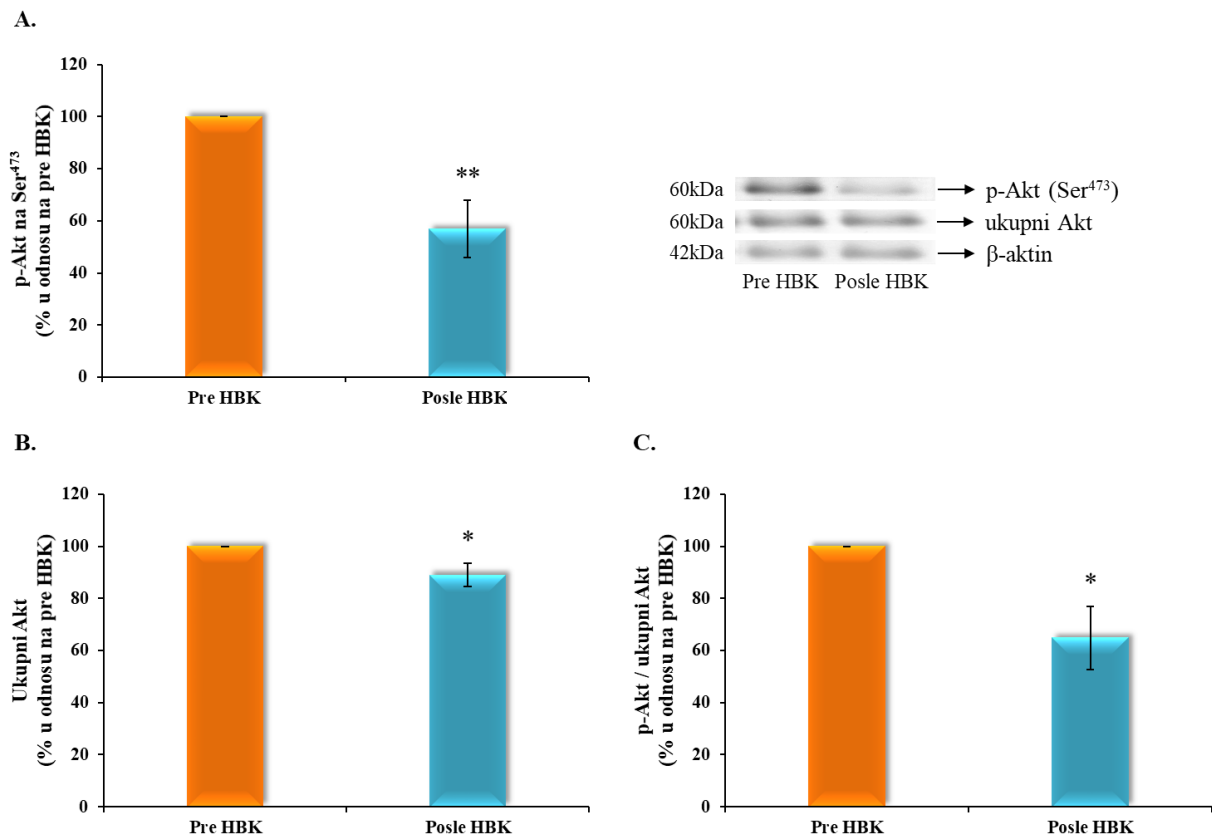
5.11.4. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju Akt u limfocitima pacijenata sa IDDM

Uzimajući u obzir literaturne podatke koji su nedvosmisleno pokazali da je u stanju DM inhibirana aktivnost Akt (Hattori i sar., 2003), što za posledicu ima poremećaj u regulaciji aktivnosti i ekspresije iNOS proteina, u daljem radu je merena ekspresija fosforilisane Akt Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³ i ukupne Akt u limfocitima, i određivan je njihov odnos pre i posle terapije HBK. Dobijeni rezultati pokazuju da je u lizatima limfocita ispitanika nakon terapije HBK došlo do smanjenja nivoa fosforilisane Akt na Thr³⁰⁸ za 26% (posle HBK = $74 \pm 9\%$, $p < 0,01$) (**Slika 18A.**), fosforilisane Akt na Ser⁴⁷³ za 43% (posle HBK = $57 \pm 11\%$, $p < 0,01$) (**Slika 19A.**) kao i ukupne Akt za 11% (posle HBK = $89 \pm 4\%$, $p < 0,05$) (**Slika 18B. i 19B.**), u poređenju sa izmerenim vrednostima pre početka terapije. Izračunavanjem odnosa fosforilisane Akt na Thr³⁰⁸ i ukupne Akt ustanovljeno je da je nakon terapije HBK došlo do povećanja fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ za 35% (posle HBK = $135 \pm 6\%$, $p < 0,001$) (**Slika 18C.**). Takođe, analiziranjem odnosa nivoa fosforilisane Akt na Ser⁴⁷³ i nivoa ukupne Akt ustanovljeno je da je nakon terapije HBK došlo do smanjenja fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ za 35% u lizatima limfocita ispitanika (posle HBK = $65 \pm 12\%$, $p < 0,05$) (**Slika 19C.**).



Slika 18. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju Akt na Thr³⁰⁸ u limfocitima pacijenata sa IDDM

A. Nivo fosforilisane Akt na Thr³⁰⁸ (p-Akt Thr³⁰⁸); **B.** Nivo ekspresije ukupne Akt; **C.** Odnos fosforilisane Akt na Thr³⁰⁸ i ukupne Akt. (n=5-7) *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na dobijene vrednosti pre terapije HBK i predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM



Slika 19. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju Akt na Ser⁴⁷³ u limfocitima pacijenata sa IDDM

A. Nivo fosforilisane Akt na Ser⁴⁷³ (p-Akt Ser⁴⁷³); **B.** Nivo ekspresije ukupne Akt; **C.** Odnos fosforilisane Akt na Ser⁴⁷³ i ukupne Akt. (n=6-8) ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK i predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM.

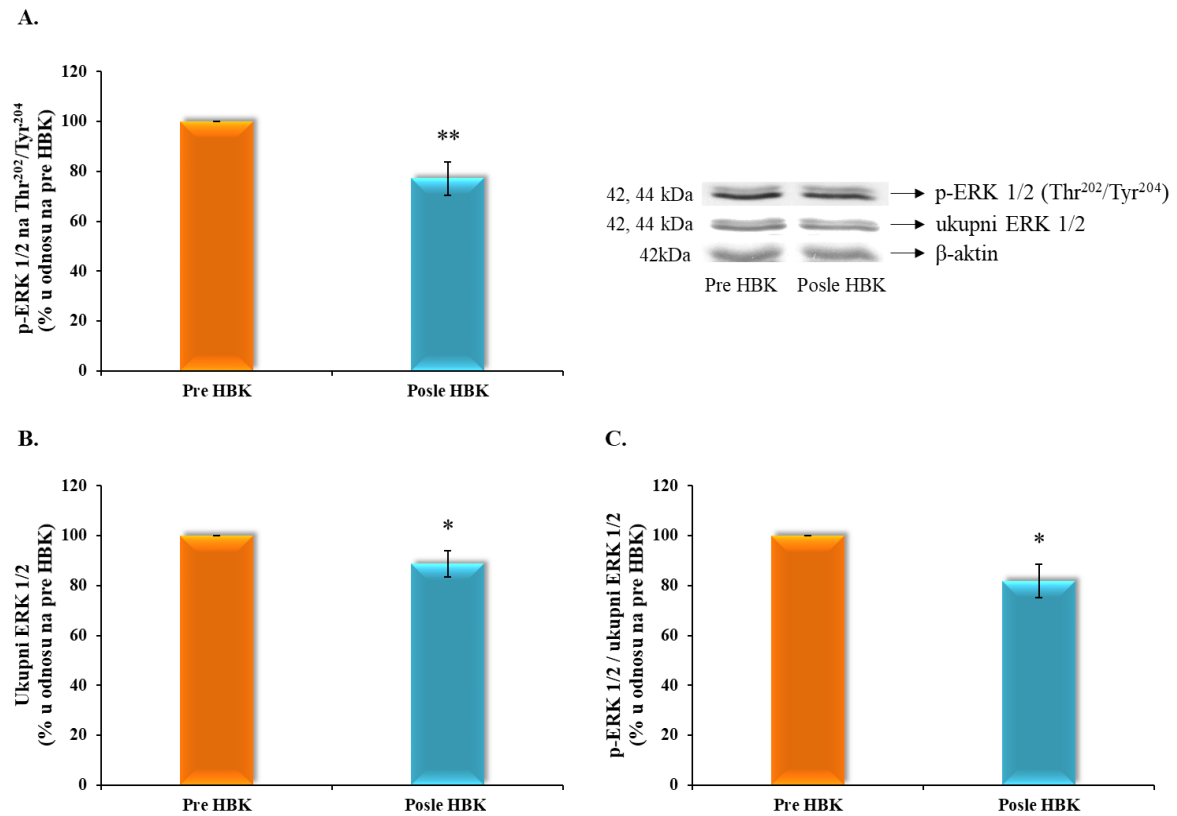
Rezultati dobijeni Pirsonovim testom linearne regresione analize nivoa fosforilacije Akt kinaze u lizatima limfocita i nivoa pojedinačnih MK plazme ispitanika, između kojih je postojala statistički značajna korelacija pre HBK terapije prikazani su u **Tabeli 9**. Dobijeni rezultati su pokazali da postoji pozitivna korelacija između nivoa fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ u lizatima limfocita i nivoa linolne kiseline u plazmi ispitanika ($r = +0,954$; $p < 0,05$).

Tabela 9. Prikaz rezultata linearne regresione analize nivoa fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ u limfocitima i nivoa linolne kiseline u plazmi ispitanika pre terapije HBK

Parametri		Koeficijent korelacije - r	p
Nivo fosforilacije Akt na Thr ³⁰⁸ u limfocitima (%) pre HBK	Nivo linolne kiseline u plazmi (%) pre HBK	+0,954	<0,05

5.11.5. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju ERK1/2 u limfocitima pacijenata sa IDDM

Na **Slici 20.** prikazani su rezultati dobijeni merenjem ekspresije fosforilisane ERK1/2 na Thr²⁰² i Tyr²⁰⁴ ostacima i ukupne ERK1/2 u lizatima limfocita ispitanika, kao i izračunavanjem njihovog odnosa pre početka i nakon terapije HBK. Rezultati pokazuju da je nakon terapije HBK došlo do smanjenja nivoa fosforilisane ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ za 23% (posle HBK = 77 ± 7%, $p < 0,01$) (**Slika 20A.**) i ukupne ERK1/2 za 11% u lizatima limfocita (posle HBK = 89 ± 5%, $p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima izmerenim pre terapije HBK (**Slika 20B.**). Takođe je uočeno i smanjenje u odnosu fosforilisane i ukupne ERK1/2 u limfocitima ispitanika za 18% nakon 10 tretmana terapije HBK (posle HBK = 82 ± 7%, $p < 0,05$) u poređenju sa izmerenim vrednostima pre početka terapije HBK (**Slika 20C.**).

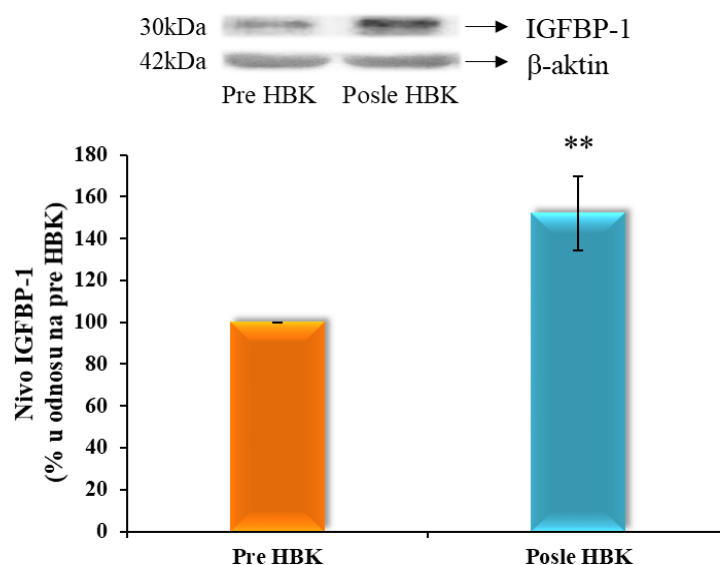


Slika 20. Uticaj terapije HBK na ekspresiju i fosforilaciju ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ u limfocitima pacijenata sa IDDM

A. Nivo fosforilisane ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (p-ERK1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴); **B.** Nivo ekspresije ukupne ERK1/2; **C.** Odnos fosforilisane ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i ukupne ERK1/2. (n=13-14) ** p<0,01; * p<0,05. Rezultati su izraženi kao % u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK i predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM.

5.12. Uticaj terapije HBK na ekspresiju IGFBP-1 u serumu pacijenata sa IDDM

Protein IGFBP-1 je prvi u nizu 6 homologih proteina familije IGFBP koji u cirkulaciji vezuju IGF i sprečavaju njegovo vezivanje za specifični receptor na plazma membrani, regulišući time dostupnost i funkciju IGF u vaskulaturi (Kelley i sar., 1996). Poznato je da u krvi pacijenata sa DM dolazi do poremećaja u nivou IGFBP-1, što za posledicu ima razvoj vaskularnih komplikacija (Bereket i sar., 1999). U skladu sa tim, dalje je izučavan efekat HBK na ekspresiju IGFBP-1 u serumu obolelih od IDDM (**Slika 21.**). Dobijeni rezultati pokazuju da je u serumu ispitanika nakon terapije HBK došlo do povećanja nivoa IGFBP-1 za 52% u poređenju sa izmerenim vrednostima pre početka terapije (posle HBK = $152 \pm 18\%$, $p < 0,01$).



Slika 21. Uticaj terapije HBK na ekspresiju IGFBP-1 u serumu pacijenata sa IDDM

Rezultati ekspresije IGFBP-1 u serumu izraženi su kao % u odnosu na vrednosti dobijene pre terapije HBK i predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost \pm SEM. ($n=19$) ** $p < 0,01$.

6. Diskusija

Ova doktorska disertacija obuhvata istraživanja u kojima je izučavan efekat terapije HBK na nivo i sastav MK u plazmi, kao i regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM. Polazna hipoteza istraživanja je bila da terapija HBK ostvaruje povoljne efekte kod obolelih od IDDM sa vaskularnim komplikacijama, na taj način što utiče na promenu nivoa i sastava MK u plazmi i reguliše ekspresiju i aktivnost iNOS, molekulskim mehanizmom koji uključuje IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 i NF κ B signalne molekule. U postavci osnovne hipoteze pošlo se od pretpostavke da usled neadekvatne kontrole IDDM dolazi do hiperglikemije, posledične hipoksije tkiva, poremećaja metabolizma masti koji se karakteriše dislipidemijom i povećanim nivoom MK u plazmi, povećanja koncentracije markera inflamacije i nivoa IGFBP-1, kao i poremećaja signalnih puteva insulina, što rezultira povećanjem ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima obolelih od IDDM sa vaskularnim komplikacijama.

Poznato je da MK i iNOS predstavljaju jedne od ključnih medijatora metaboličkih poremećaja i inflamacije u stanju DM i da poremećaj u njihovoj sintezi dovodi do štetnih efekata na signalni put insulina (Meade i Mertin, 1978; Assmann i sar., 2016; Wei i sar., 2016). Poremećaj u nivou i sastavu MK plazme i fosfolipida u membranama narušava strukturu i propustljivost ćelijskih membrana, prenos signala kroz membranu, aktivnost receptora na ćelijskim membranama (LDL receptor, receptore spregnute sa G proteinom (GPR, *engl. G protein-coupled receptors*), itd.) kao i transkripciju određenih gena (među kojima je i iNOS) (Costabile i sar., 2005; de Lima i sar., 2006; Briggs i sar., 2017). Na taj način ispoljavaju se inflamatorna i aterogena svojstva MK. Prekomerna ekspresija iNOS u stanju hiperglikemije i hipoksije tkiva doprinosi razvoju inflamacije, disfunkcije endotela i vaskularnih komplikacija, a može dovesti i do apoptoze β -ćelija pankreasa (Eizirik i sar., 1994; Kitayama i sar., 2006).

Terapija HBK ostvaruje različite efekte na signalne molekule uključene u patogenezu DM i vaskularnih komplikacija (Unfirer i sar., 2008). Literaturni podaci su pokazali da HBK

utiče na sastav i nivo MK u plazmi i membranama ćelija tako što inhibira signalnu kaskadu izazvanu hipoksijom, koja narušava strukturu membrana, sprečava oslobađanje MK iz ćelijskih membrana, smanjuje sintezu ROS i lipidnu peroksidaciju i utiče na aktivnost enzima uključenih u elongaciju i desaturaciju MK (Eikelboom i sar., 2000; Pantović i sar., 2005; Naidina i sar., 2009). Uvidom u literaturu do sada su istraživanja uglavnom fokusirana na uticaj terapije HBK na zarastanje rana izazvanih ishemijom kod obolelih od DM (Goldstein i sar., 2006; Boykin i Baylis, 2007; Gurdol i sar., 2010). Rezultati tih istraživanja su pokazali da nakon terapije HBK dolazi do lokalnog povećanja koncentracije NO u plazmi i ishemičnom tkivu, što doprinosi angiogenezi i zarastanju rana. Terapija HBK, takođe, utiče i na smanjenje ekspresije iNOS i inflamatornih citokina, što doprinosi smanjenju inflamacije i obimu aterosklerotskih lezija, ukazujući na antiinflamatornu ulogu HBK u različitim patološkim stanjima (Kudchodkar i sar., 2000; Pedoto i sar., 2003; Yuan i sar., 2004). Uticaj HBK na regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS kod IDDM pacijenata još nije dovoljno razjašnjen. Takođe, ne postoje literaturni podaci koji povezuju promene u nivou i sastavu MK plazme, kao i ekspresiji i aktivnosti iNOS sa promenama u ekspresiji signalnih molekula: IRS-1, PI3K, Akt i ERK u limfocitima pacijenata sa IDDM pod uticajem terapije HBK. Nedovoljno je ispitan i uticaj terapije HBK na koncentraciju glukoze, insulina, lipida, fosfolipida, SMK, CRP, Hcy, NO i IGFBP-1 u krvi pacijenata sa IDDM. Zbog svega navedenog, eksperimenti obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom osmišljeni su sa ciljem da se ispituju rani efekti tretmana HBK na sastav MK i regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS kod obolelih od IDDM sa vaskularnim komplikacijama.

Rezultati empirijskih istraživanja su pokazali da je doza koja je korišćena prilikom izlaganja pacijenata HBK, kao i dužina izlaganja optimalna za lečenje perifernih vaskularnih komplikacija kod obolelih od IDDM (Milačić i sar., 2015). Efekat HBK procenjivan je poređenjem vrednosti analiziranih parametara pre i posle terapije HBK. U većini objavljenih *in vitro* i *in vivo* studija koje su ispitivale efekat HBK na molekulske mehanizme uključene u proces zarastanja rana i angiogeneze kod pacijenata sa DM, korišćeni su uzorci plazme, ćelije krvnih sudova i tkiva zahvaćena ishemijom (Goldstein i sar., 2006; Boykin i Baylis, 2007; Gurdol i sar., 2010), dok su za eksperimente u okviru ove doktorske disertacije korišćeni uzorci krvi i izolovani limfociti obolelih od IDDM. Poznato je da su limfociti među prvim ćelijama imunskog sistema koje se iz periferne krvi regrutuju na mesto povrede tkiva u cilju zaštite od patogenih činioca i sanacije povrede (Shi i Pamer, 2011), ali su takođe i medijatori inflamatornih procesa i oboljenja, kao što su ateroskleroza i DM (Shi i Pamer, 2011; Zhong i sar., 2017). Kod obolelih od IDDM, usled hiperglikemije dolazi do poremećaja u aktivnosti

limfocita, što može uticati na njihovu funkciju u imunskom odgovoru (Otton i sar., 2002). Limfociti aktivirani inflamatornim citokinima, SMK, ROS i različitim patogenima imaju ključnu ulogu u pokretanju inflamatornog procesa i razvoju IR u metabolički aktivnim organima, što dovodi do razvoja DM i vaskularnih komplikacija (Xia i sar., 2017; Clark i sar., 2017). Uzimajući u obzir da limfociti predstavljaju medijatore inflamacije (Koyasu i Moro, 2012), oni predstavljaju prikladan model za istraživanje molekulskih mehanizama inflamacije kod obolelih od IDDM sa vaskularnim komplikacijama.

Usled neadekvatne glikemijske kontrole kod pacijenata sa IDDM dolazi do razvoja akutne, a zatim i hronične hiperglikemije, koja je jedna od glavnih komponenti u procesu patogeneze niza vaskularnih komplikacija (Kitada i sar., 2010). U cilju izučavanja efekata terapije HBK na regulaciju parametara metabolizma glukoze korišćeni su uzorci seruma pacijenata sa IDDM i vaskularnim komplikacijama pre i nakon 10 tretmana HBK. Dobijeni rezultati pokazuju da su koncentracije glukoze i insulina u serumu značajno smanjene nakon terapije HBK (**Slike 2. i 3.**), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da HBK snižava glikemiju kod obolelih od DM i povećava osetljivost tkiva na insulin već posle trećeg dana terapije (Wilkinson i sar., 2015; Xu i sar., 2017; Irawan i sar., 2018). Takođe, primećeno je da povoljan uticaj terapije HBK na parametre metabolizma glukoze često nameće potrebu za smanjenjem doze egzogenog insulina kod obolelih od IDDM. Liang i saradnici su ukazali da HBK ostvaruje povoljno dejstvo na glikemiju i osetljivost tkiva na insulin tako što povećava koncentraciju adiponektina koji reguliše ekspresiju transportera za glukozu 4 (Glut4) posredstvom Akt, i time se povećava unos glukoze u ćeliju (Liang i sar., 2018). Predtretman HBK na modelu miševa sa ishemijskim moždanim infarktom i hiperglikemijom povećava ekspresiju gama receptora aktivacije proliferacije peroksizoma (PPAR γ , *engl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*), uključenog u homeostazu glukoze i povećanje senzitivnosti tkiva na insulin, te i na taj način terapija HBK snižava glikemiju i smanjuje inflamaciju u ovom eksperimentalnom modelu (Quintero i sar., 2012; Bian i sar., 2015). Smatra se da terapija HBK ostvaruje povoljan uticaj na parametre metabolizma glukoze tako što smanjuje hipoksiju i inflamaciju za koje je poznato da mogu sinergistički inhibirati aktivnost molekula uključenih u signalnu kaskadu insulina, i na taj način HBK doprinosi aktivaciji molekula uključenih u mehanizam delovanja insulina i povećanoj osetljivosti tkiva na insulin (Wilkinson i sar., 2012). Navedeni efekti terapije HBK doprinose bržem zarastanju rana i smanjenju disfunkcije endotela perifernih krvnih sudova izazvanih hiperglikemijom i ishemijom (Wilkinson i sar., 2012; Nwafor i Collins, 2014), što ukazuje da je primena terapije HBK efektivna komponenta kompleksnog lečenja IDDM i

pratećih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija, što je pokazano i u ovoj doktorskoj disertaciji.

Kod obolelih od IDDM uočava se i poremećaj u koncentraciji parametara lipidnog profila- dislipidemija, tj. povećana koncentracija ukupnog holesterola, Tg i LDL, kao i smanjena koncentracija HDL u plazmi u odnosu na referentne vrednosti, što se dovodi u vezu sa povećanim rizikom za ubrzanje procesa ateroskleroze i KVB kod obolelih od DM (Hannon i sar., 2006; Taylor, 2012; Vaneckova i sar., 2014; NCD Risk Factor Collaboration, 2017). Navedene promene u koncentraciji lipida kod dijabetičara mogu se delimično objasniti evidentnim poremećajem u metabolizmu glukoze, ali i visokom koncentracijom insulina u krvi u perifernoj cirkulaciji, izazvanom subkutanom primenom insulina (Liu i sar., 2010). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da usled heterogenosti ispitivane grupe (starosna struktura, pol, dužina trajanja bolesti i prateća oboljenja) postoji veliki opseg između apsolutnih vrednosti parametara lipidnog profila pacijenata sa IDDM i izmerene vrednosti lipida pacijenata variraju od referentnih do vrednosti koje ukazuju na povišen rizik za nastanak KVB (Haffner i sar., 1990). Nakon 10 tretmana HBK došlo je do značajnog smanjenja koncentracije ukupnog holesterola, holesterola bez HDL, Tg i LDL u plazmi obolelih od IDDM u odnosu na vrednosti izmerene pre terapije (**Slika 4.**). Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima objavljenim u drugim studijama (Levy-Marchal i sar., 2010; Redondo i sar., 2014) i ukazuju da terapija HBK ostvaruje povoljne efekte na pacijente sa IDDM i vaskularnim komplikacijama. Kao moguće objašnjenje ovako dobijenih rezultata je da terapija HBK smanjenjem koncentracije glukoze, koja zajedno sa MK čini glavni supstrat za sintezu Tg, smanjuje koncentraciju Tg u plazmi i ostvaruje povoljne efekte na metabolizam lipoproteina. Potencijalni mehanizam smanjenja koncentracije holesterola, Tg i LDL u plazmi pod uticajem HBK mogao bi da uključuje neenzimsku glikozilaciju lipoproteina i omogućava neometano vezivanje lipoproteina za njihove receptore na površini ćelijske membrane, čime se smanjuje koncentracija lipoproteina u cirkulaciji (Pietri i sar., 1983; Ray i sar., 2009). Rezultati merenja koncentracije HDL u plazmi pacijenata sa IDDM nakon terapije HBK, pokazuju da postoji tendencija porasta koncentracije HDL, međutim, nije zapažena statistički značajna promena koncentracije HDL u odnosu na vrednosti izmerene pre terapije. Izostanak statistički značajnog uticaja terapije HBK na koncentraciju HDL može se objasniti malim brojem pacijenata uključenih u pilot studiju iz koje su proistekli rezultati ove doktorske disertacije ili nedovoljnom dužinom trajanja terapije, tj. kratkoročnim efektima terapije HBK.

Promene u koncentraciji lipida u plazmi obolelih od IDDM, kao i njihovi međusobni odnosi imaju poseban značaj u proceni rizika za razvoj vaskularnih komplikacija, posebno cerebro- i kardiovaskularnih događaja (Haffner i sar., 1990; Niroumand i sar., 2015). Kako bi se procenio uticaj terapije HBK na nivo rizika za nastanak vaskularnih komplikacija u ovoj doktorskoj disertaciji, računat je odnos koncentracija LDL i HDL, koji predstavlja nivo rizika za nastanak ateroskleroze, kao i odnos koncentracije ukupnog holesterola i HDL koji predstavlja nivo rizika za nastanak KVB, pre i posle terapije HBK. Dobijeni rezultati pokazuju da terapija HBK dovodi do statistički značajnog smanjenja rizika za nastanak ateroskleroze, ključnog faktora za razvoj makrovaskularnih komplikacija u DM (Zhou i sar., 2014), što je pokazano i u studijama drugih autora (Droyvold i sar., 2005). Međutim, dobijeni rezultati izračunavanja rizika za nastanak KVB nakon HBK, pokazuju da terapija HBK ne dovodi do promene u nivou rizika za nastanak KVB u odnosu na vrednosti pre terapije HBK (**Slika 5.**). Izostanak promene nivoa rizika za nastanak KVB nakon terapije HBK može se dovesti u vezu sa odsustvom statistički značajnog povećanja koncentracije HDL u plazmi pacijenata sa IDDM, koji predstavlja nezavisan faktor rizika ishemijske bolesti srca (Despres i sar., 2000). Takođe, moguće je i da ponavljanje sesije tretmana HBK može dovesti do statistički značajnog povećanja koncentracije HDL i smanjenja nivoa rizika za nastanak KVB kod pacijenata sa IDDM.

Rezultati brojnih kliničkih studija su jasno pokazali da je niska koncentracija fosfolipida i visoka koncentracija SMK u plazmi povezana sa povećanim rizikom za nastanak DM (Manna i Jain, 2012; Floegel i sar., 2013; Zhao i sar., 2015; Weijers, 2016). Poremećaj u regulaciji metabolizma MK, koje čine strukturne delove fosfolipida ćelijskih membrana povezan je i sa razvojem IR (Chang i sar., 2019). Promena u nivou i sastavu MK u membranama skeletnih mišića dovodi do smanjene senzitivnosti tkiva na insulin, ukazujući na važnu ulogu MK u modulaciji aktivnosti insulina (Borkman i sar., 1993; Vessby i sar., 1994). Oboleli od DM u fosfolipidima membrana imaju manju zastupljenost MUFA i PUFA, dok je zastupljenost SFA veća u odnosu na zdravu populaciju, što dovodi do poremećaja u prenosu signala kroz membranu, malfunkcije ćelijskih membrana (Chang i sar., 2019), i sledstveno otežane mikrocirkulacije koja vodi hipoksiji tkiva (Weijers, 2016).

Važnu ulogu u patogenezi IR i DM ima i visoka koncentracija SMK u plazmi, koja je često praćena povećanom ekspresijom inflamatornih citokina i razvojem inflamatornog procesa (Barma i sar., 2009). Uzimajući u obzir da promenjena koncentracija fosfolipida i SMK u plazmi doprinosi razvoju DM i vaskularnih komplikacija u daljem radu je izučavan uticaj HBK na koncentraciju fosfolipida i SMK u plazmi pacijenata sa IDDM i vaskularnim

komplikacijama. Dobijeni rezultati pokazuju da terapija HBK nije dovela do statistički značajne promene koncentracije fosfolipida u plazmi ispitanika (**Slika 6.**). Ovakav rezultat je očekivan i može se objasniti time da je za statistički značajnu promenu u koncentraciji fosfolipida u plazmi neophodan duži vremenski period primene terapije, tj. od 3 do 8 nedelja (Cao i sar., 2006; Meikle i sar., 2015).

U ovoj doktorskoj disertaciji uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije SMK u plazmi nakon 10 tretmana HBK (**Slika 7.**). Ovako dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja Teshigawara i saradnika koji su pokazali da HBK reguliše metabolizam SMK kod miševa sa DM, tako što povećava ekspresiju enzima uključenog u β -oksidaciju MK u mitohondrijama, karnitinska palmitoiltransferaza (CPT-1, engl. *Carnitine palmitoyltransferase 1*) kao i ekspresiju transkripcionih faktora: PPAR α i koaktivatora receptora aktivacije proliferacije peroksizoma 1 α (PGC-1 α , engl. *Peroxisome proliferator gamma coactivator-1alpha*), zaduženih za transkripciju CPT-1 i regulaciju metabolizma lipida (Teshigawara i sar., 2010). Isti autori su, takođe, pokazali da HBK utiče na smanjenje hronične inflamacije na taj način što smanjuje ekspresiju TNF α , a sledstveno i lipolizu i koncentraciju SMK u serumu. U okviru eksperimenata ove doktorske disertacije nije merena ekspresija CPT-1, PPAR α , PGC-1 α , kao ni TNF α , ali se može pretpostaviti da HBK dovodi do smanjenja koncentracije SMK u plazmi ispitanika najverovatnije tako što utiče na povećanje ekspresije CPT-1, PPAR α i PGC-1 α , kao i smanjenje nivoa TNF α , što dovodi do smanjenja lipolize, a time i smanjenja koncentracije SMK u plazmi ispitanika. Na ovaj način terapija HBK može doprineti i smanjenju inflamacije kod pacijenata sa IDDM i vaskularnim komplikacijama.

Polazeći od literaturnih podataka koji su pokazali da neadekvatna kontrola glikemije u stanju DM dovodi do oksidativnog stresa koji doprinosi promeni nivoa i sastava MK u plazmi i razvoju inflamacije (Ruiz-Gutierrez i sar., 1993; Hamilton i sar., 2003), u daljim eksperimentima je ispitivan uticaj terapije HBK na masnokiselinski sastav plazme pacijenata sa IDDM. Uzimajući u obzir da SFA i n-6 PUFA ostvaruju proinflamatorne efekte, dok MUFA i n-3 PUFA ostvaruju antiinflamatorne efekte u organizmu (Costabile i sar., 2005), izučavan je nivo ukupnih SFA, MUFA, n-3 i n-6 PUFA, kao i nivo pojedinačnih MK u plazmi pacijenata sa IDDM pre i posle primene terapije HBK. Takođe je izučavan uticaj terapije HBK na aktivnost enzima desaturaza i elongaza, enzima uključenih u proces sinteze MK.

Dobijeni rezultati iz ovih eksperimenata pokazuju da terapija HBK nije dovela do promene nivoa ukupnih SFA u plazmi, ali je uticala na statistički značajne promene nivoa

pojedinačnih SFA, tj. povećala je nivo palmitinske kiseline i smanjila nivo stearinske kiseline u plazmi u poređenju sa vrednostima pre terapije (**Tabela 4.**). Dobijeni rezultati mogu se objasniti time da se stearinska kiselina brže konvertuje u MUFA u odnosu na palmitinsku kiselinu, posredstvom enzima desaturaze $\Delta 9$ (Bruce i Salter, 1996), čija je aktivnost povećana nakon terapije HBK kod pacijenata sa IDDM (**Tabela 6.**). Takođe, pod uticajem terapije HBK je došlo i do smanjenja aktivnosti elongaze, što je procenjeno na osnovu izračunatog odnosa nivoa stearinske i palmitinske kiseline u plazmi. Smanjena aktivnost elongaze nakon 10 tretmana HBK objašnjava se smanjenim nivoom stearinske kiseline u odnosu na povećani nivo palmitinske kiseline u plazmi (**Tabela 6.**). Povećani nivo palmitinske kiseline u plazmi smatra se nepoželjnim jer ova MK može narušiti molekulski mehanizam delovanja insulina i doprineti razvoju IR, a ima i veći aterogeni potencijal nego stearinska kiselina u plazmi (Ristic-Medic i sar., 2009; Talbot i sar., 2014).

Rezultati merenja udela MUFA u odnosu na ukupne MK u plazmi pokazuju da terapija HBK nije dovela do promene nivoa ukupnih MUFA, kao ni promene nivoa oleinske i vakcenske kiseline, ali je došlo do statistički značajnog povećanja nivoa palmitoleinske kiseline u plazmi nakon terapije HBK u poređenju sa vrednostima pre terapije (**Tabela 4.**). Uočeno povećanje nivoa palmitoleinske kiseline u plazmi pacijenata sa IDDM nakon terapije HBK može biti delimično odgovorno za inhibiciju inflamatornog odgovora izazvanog visokim nivoom palmitinske kiseline u plazmi ispitanika. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati iz literature koji su pokazali da palmitoleinska kiselina ostvaruje antiinflamatorna svojstva tako što sprečava aktivaciju makrofaga i smanjuje ekspresiju inflamatornih citokina i transkripcionih faktora uključenih u inflamatorni odgovor koji je izazvan tretmanom sa palmitinskom kiselinom (Talbot i sar., 2014).

Literaturni podaci su pokazali da oboleli od DM imaju nizak udeo n-3 PUFA, posebno nizak nivo dokozaheksaeninske kiseline, kao i da je neophodan unos dodataka ishrane ili konzumiranje hrane bogate n-3 PUFA, kako bi se povećao nivo ovih MK u plazmi neophodnih za normalno funkcionisanje cerebrovaskularnog i kardiovaskularnog sistema (Lefkowitz i sar., 1990; Tikhonenko i sar., 2010; Zhao i sar., 2014). Rezultati dobijeni merenjem udela n-3 PUFA u odnosu na ukupan masnokiselinski sastav plazme obolelih od IDDM nakon 10 tretmana HBK, pokazuju da nije došlo do promene u nivou ukupnih PUFA, kao i ni u nivou eikozapentaeninske kiseline, međutim uočeno je statistički značajno smanjenje nivoa α -linoleinske kiseline, kao i povećanje nivoa dokozaheksaeninske i dokozaheksaeninske kiseline u plazmi u poređenju sa izmerenim vrednostima pre terapije (**Tabela 4.**). Polazeći od činjenice da je esencijalna α -linoleinska kiselina prekursor za n-3

PUFA dugog lanca (Hirano, 2018), dobijeni rezultati koji pokazuju smanjenje nivoa α -linoleinske kiseline mogu se objasniti uticajem terapije HBK na povećanje konverzije α -linoleinske kiseline u MK dužeg lanca, kao što su dokozapentaenoinska i dokozahexaenoinska kiselina. Visok nivo navedenih MK u plazmi i membranama eritrocita ostvaruje povoljne efekte na metabolizam glukoze i lipida, i povezan je sa smanjenim rizikom za razvoj IDDM (Dewailly i sar., 2003; Norris i sar., 2007; Kim i sar., 2015). Dokozapentaenoinska i dokozahexaenoinska kiselina u plazmi poboljšavaju senzitivnost ćelija na insulin i smanjuju glikemiju vezujući se za GPR40 u β -ćelijama pankreasa, GPR120 na adipocitima i aktivirajući PPAR- α i PPAR- γ u jetri (Morgan i Dhayal, 2009; Kalupahana i sar., 2011; Li i sar., 2014; Guo i sar., 2018). Visok nivo dokozahexaenoinske kiseline u plazmi smanjuje veličinu HDL čestica, što utiče na smanjenje rizika za razvoj DM i KVB (Tani i sar., 2018). Takođe, dokozahexaenoinska kiselina povećava veličinu LDL čestica i smanjuje koncentraciju Tg tako što inhibira enzime uključene u metabolizam lipida kao što su: fosfatidna fosfataza i lecitin-holesterol aciltransferaza, te na taj način sprečava razvoj ateroskleroze i pospešuje vaskularnu funkciju (Kinsella i sar., 1990; Erkkila i sar., 2004; Tani i sar., 2018). Dokozahexaenoinska kiselina ostvaruje antiinflamatornu ulogu kod obolelih od DM na taj način što reguliše sintezu eikozanoida, transkripciju gena uključenih u inflamatorni odgovor organizma (npr. NF κ B), smanjuje sintezu ROS i inflamatornih citokina, inhibira proliferaciju i aktivnost limfocita i ćelija prirodnih ubica (NK ćelije, *engl. Natural Killer Cells*) (Krishna Mohan i Das, 2001; Calder i Grimble, 2002; Wang i sar., 2003). Uzimajući u obzir da su slobodne n-3 PUFA i n-6 PUFA u kompeticiji za isti supstrat (Δ 5 i Δ 6 desaturaze), od njihovog međusobnog odnosa zavisi da li će se ispoljiti antiinflamatorna (više n-3 PUFA) ili proinflamatorna svojstva (više n-6 PUFA) (Costabile i sar., 2005). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da terapija HBK u strogo kontrolisanim bolničkim uslovima ostvaruje povoljne efekte na obolele od DM tako što promenom udela pojedinačnih n-3 PUFA u odnosu na ukupne MK plazme omogućava ostvarivanje njihovih antiinflamatornih i antiaterogenih svojstava.

Imajući u vidu literaturne podatke koji su pokazali da su n-6 PUFA medijatori inflamacije, kao i da visok nivo n-6 PUFA povećava rizik za razvoj DM (Wald i sar., 2002; Chuang i sar., 2012), u daljem radu je analiziran udeo ukupnih i pojedinačnih n-6 PUFA u odnosu na ukupne MK plazme pod uticajem terapije HBK kod pacijenata sa IDDM. Dobijeni rezultati pokazuju da nakon terapije HBK nije došlo do promene u nivou ukupnih n-6 PUFA, kao ni u nivou γ -linolne, dihomo- γ -linolne, arahidonske i adreninske kiseline, ali je uočeno statistički značajno smanjenje nivoa linolne kiseline u plazmi u poređenju sa vrednostima pre

terapije (**Tabela 4.**). Iako nije zabeležena statistički značajna promena nivoa izučavanih pojedinačnih n-6 PUFA, smanjenje nivoa linolne kiseline u plazmi nakon terapije HBK je očekivano jer je ova MK esencijalna i od nje nastaju sve druge n-6 PUFA. Poznato je da visok nivo linolne kiseline može dovesti do disfunkcije ćelijske membrane, povećati sintezu ROS i ekspresiju NF κ B, koja može voditi ekspresiji gena uključenih u proces inflamacije i ateroskleroze (Toborek i sar., 1996), te je moguće da posredstvom smanjenja nivoa linolne kiseline u plazmi HBK može uticati i na ekspresiju signalnih molekula i transkripcionih faktora koji učestvuju u procesu inflamacije i ateroskleroze. Na osnovu dobijenih rezultata moglo bi se pretpostaviti da terapija HBK ostvaruje povoljne efekte na vaskularnu funkciju obolelih od IDDM i tako što menja sastav MK u lipidima plazme. Međutim, mehanizam kojim HBK utiče na promenu sastava MK u plazmi još nije dovoljno razjašnjen. Brown i saradnici su pokazali da primena HBK pod pritiskom 2,2 ATA podstiče sintezu MK i utiče na relativnu promenu nivoa pojedinačnih MK tako što reguliše ekspresiju i aktivnost enzima uključenih u deasaturaciju i elongaciju MK (Brown i sar., 1971). Rezultati koji se odnose na izračunavanje aktivnosti $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaza (neophodnih za konverziju α -linoleinska kiselina u ostale n-3 PUFA i linolna kiselina u n-6 PUFA), kao i aktivnost elongaze, pokazuju da je tretman HBK doveo do smanjenja aktivnosti $\Delta 5$, uz izostanak statistički značajne promene aktivnosti $\Delta 6$ i povećane aktivnosti elongaze u odnosu na vrednosti pre terapije HBK (**Tabela 6.**). Ovako dobijeni rezultati mogu se objasniti time da povećan nivo dokozapentaenoinske i dokozaheksaenoinske kiseline u plazmi nakon terapije HBK negativnom povratnom spregom regulišu aktivnost deasaturaze $\Delta 5$ i na taj način utiče na smanjenje ekspresije desaturaza i transkripcionih faktora uključenih u metabolizam masti (Brenner, 2003; Davidson i sar., 2018).

Klinička manifestacija inflamacije karakteriše se visokom koncentracijom proteina akutne faze inflamacije, kao što je CRP (Nesto, 2004; Marseglia i sar., 2015) i visoke koncentracije Hcy (Li i sar., 2015; Obradovic i sar., 2018) i NO u serumu, koji ostvaruju jednu od ključnih uloga u razvoju ateroskleroze, vaskularnih komplikacija i KVB kod obolelih od DM (Stanger i Weger, 2003; Kleinbongard i sar., 2006; S., 2011). Rezultati novijih studija su ukazali na postojanje pozitivne asocijacije između visoke koncentracije CRP, Hcy i NO u uzorcima krvi obolelih od KVB (Ikeda i sar., 2002; Woo i sar., 2003; Li i sar., 2015). Polazeći od rezultata iz literature koji su pokazali da terapija insulinom ne dovodi do smanjenja koncentracija CRP i Hcy, čak i nakon snižavanja nivoa glikemije pacijenata sa IDDM (Stentz i sar., 2004), u daljem radu je praćen efekat terapije HBK na koncentraciju pomenutih markera inflamacije (CRP, Hcy i NO) kod pacijenata sa IDDM.

Rezultati pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije CRP u serumu pacijenata sa IDDM u odnosu na vrednosti izmerene pre terapije (**Slika 8.**). Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima istraživanja drugih autora koji su pokazali da terapija HBK smanjuje koncentraciju CRP u serumu obolelih od DM sa vaskularnim komplikacijama (Rossignol i sar., 2007; Karadurmus i sar., 2010; Chen i sar., 2017), što ukazuje na smanjenje inflamacije kod ovih pacijenata. HBK ostvaruje inhibitorni efekat na sintezu CRP u jetri tako što smanjuje koncentraciju glukoze i SMK u plazmi (Sheldon i sar., 1993; Al-Waili i Butler, 2006), koje dovode do smanjenja ekspresije inflamatornih citokina (IL-1, IL-6 i TNF α), za koje je pokazano da *in vitro* i *in vivo* uslovima podstiču sintezu CRP u hepatocitima (Sheldon i sar., 1993; Al-Waili i Butler, 2006).

Visoka koncentracija Hcy u plazmi karakteristična je za obolele od DM sa vaskularnim komplikacijama i uočeno je postojanje pozitivne korelacije sa CRP, NO i faktorima rizika za razvoj KVB kao što su dislipidemija, IR, HTA, ateroskleroza itd. (Li i sar., 2015; Obradovic i sar., 2018). Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da terapija HBK nije dovela do statistički značajne promene koncentracije Hcy u plazmi pacijenata sa IDDM (**Slika 9.**). Na osnovu ograničenih literaturnih podataka pokazano je da HBK ne ostvaruje direktan efekat na koncentraciju Hcy u plazmi (Sharer i sar., 1983), ali ona može ublažiti simptome izazvane HHcy (Domachevsky i sar., 2004). Terapija HBK bi mogla posredno uticati na koncentraciju Hcy u serumu preko efekta na sastav pojedinačnih MK (Nikolic Turnic i sar., 2019). Niska koncentracija Hcy u serumu povezana je sa visokim nivoom eikozapentaenske kiseline i n-6 PUFA (Nikolic Turnic i sar., 2019). Uočen nivo eikozapentaenske kiseline u plazmi ispitanika niži je u poređenju sa zdravom populacijom (Albert i sar., 2002), što se dovede u vezu sa visokom koncentracijom Hcy u serumu ispitanika pre terapije. Dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije koji su pokazali da nije uočena statistički značajna promena u nivou eikozapentaenske kiseline i n-6 PUFA u plazmi ispitanika nakon terapije HBK mogli bi se dovesti u vezu sa izostankom promene u koncentraciji Hcy u serumu ispitanika izloženih HBK.

Imajući u vidu da su brojni literaturni podaci ukazali na to da hiperglikemija dovodi do povećanja koncentracije NO tako što povećava ekspresiju iNOS i doprinosi razvoju inflamacije (Sugita i sar., 2002; Di Pietro i sar., 2013), kao i da visoka koncentracija SMK, CRP i Hcy u krvi može povećati sintezu NO u različitim ćelijama (Shimabukuro i sar., 1997; Ikeda i sar., 1999; Ikeda i sar., 2002), dalje će biti diskutovani rezultati merenja koncentracije NO $_2^-$ /NO $_3^-$ u serumu. Rezultati pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije NO $_2^-$ /NO $_3^-$ u serumu u odnosu na vrednosti pre terapije (**Slika 10.**).

Mehanizam kojim HBK ostvaruje redukujući efekat na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u serumu nije u potpunosti razjašnjen. Polazeći od saznanja da postoji povezanost između koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u serumu, koncentracije glukoze, SMK i CRP u serumu obolelih od DM (Shimabukuro i sar., 1997; Ikeda i sar., 2002; Adela i sar., 2015), moguće je da terapija smanjujući visoke koncentracije glukoze, SMK i CRP u serumu pacijenata sa IDDM utiče na smanjenje sinteze NO.

Uzimajući u obzir da je inducibilna izoforma NOS prvi put okarakterisana u mononuklearnim ćelijama imunskog sistema miševa (Lyons i sar., 1992), i da je u odnosu na druge ova izoforma zastupljenija u limfocitima periferne krvi čoveka (Saluja i sar., 2011), izučavan je uticaj terapije HBK na ekspresiju iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM. Kod pacijenata sa IDDM uočeno je da je terapija HBK dovela do značajnog smanjenja ekspresije iNOS u limfocitima (**Slika 12.**), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da HBK dovodi do smanjenja ekspresije i aktivnosti iNOS kod ljudi i eksperimentalnih životinja (Yuan i sar., 2004; Puthuchearry i sar., 2006; Kudchodkar i sar., 2007). HBK je dovela do smanjenja koncentracije glukoze, SMK i markera inflamacije, koji svi zajedno mogu uticati na smanjenje aktivacije transkripcionih faktora uključenih u ekspresiju iNOS, što rezultira smanjenjem ekspresije i aktivnosti iNOS. Poznato je da na ekspresiju iNOS mogu uticati i određene MK, među kojima je i dokozaheksaenoinjska kiselina (Kielar i sar., 2003), čiji je nivo značajno povećan u plazmi ispitanika posle terapije HBK. Kielar i saradnici su pokazali da visok nivo dokozaheksaenoinjske kiseline u plazmi miševa smanjuje relativnu ekspresiju citokina utičući na smanjenu aktivnost transkripcionog faktora NF κ B i posledičnu inhibiciju iNOS (Kielar i sar., 2003). Isti autori su pokazali da dokozaheksaenoinjska kiselina inhibira ekspresiju iNOS u makrofagima miševa tako što smanjuje relativnu ekspresiju regulatornog faktora interferona 1 (*IRF-1*, engl. *Interferon Regulatory Factor*) i na taj način inaktivira elemente odgovora za IRF-1 i NF κ B na promotoru gena za iNOS (Kielar i sar., 2000). Dobijeno smanjenje ekspresije iNOS i koncentracije NO se može objasniti i time da terapija HBK povećavajući nivo dokozaheksaenoinjske kiseline u plazmi utiče na smanjenje ekspresije iNOS u limfocitima, posredstvom inaktivacije elemenata odgovora za IRF-1 i NF κ B na promotoru gena za iNOS čime se sprečava transkripcija ovog gena (Kielar i sar., 2000), time se smanjuje inflamaciju koja bi dovela do povrede vaskularnog sistema pacijenta sa IDDM. Dalje, dobijeni rezultati pokazuju da je nakon terapije HBK uočena statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa iNOS u limfocitima i koncentracije Tg u plazmi ispitanika (**Tabela 7.**), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su, takođe, pokazali da selektivna ekspresija

iNOS u jetri dovodi do povećanja koncentracije Tg u plazmi što doprinosi razvoju hiperglikemije i IR (Shinozaki i sar., 2011). Takođe, Puthanveetil i saradnici su ukazali da bi inhibicija iNOS mogla da spreči translokaciju glukoproteina uključenog u transport MK i akumulaciju Tg (CD36) na membranu, i tako doprinese smanjenju akumulacije Tg i uspori razvoj kardiovaskularnih komplikacija povezanih sa gojaznošću i DM (Puthanveetil i sar., 2011).

Polazeći od činjenice da enzim arginaza konvertuje L-arginina u L-ornitin i ureu, i da se nalazi u kompeticiji za isti supstrat (L-arginin) sa NOS (Green i sar., 1982), u daljem radu je izučavana aktivnost ovog enzima i dobijeni rezultat pokazuje da je terapija HBK uticala na povećanje njegove aktivnosti (**Slika 11.**). Dobijeni rezultati smanjenja ekspresije i aktivnosti iNOS pod uticajem terapije HBK ukazuju na to da se manja količina supstrata L-arginina koristi za sintezu NO, a veća za aktivnost enzima arginaze. Dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima studija drugih autora koji, takođe, dovode u direktnu vezu aktivnost arginaze i aktivnost iNOS, i pokazuju da su nivo aktivnosti arginaze i nivo aktivnosti iNOS obrnuto proporcionalni (Modolell i sar., 1995; Mori i Gotoh, 2000; Morris i sar., 2004).

Dalji eksperimenti u okviru ove doktorske disertacije bili su usmereni na ispitivanje uloge ekspresije signalnih molekula, kao što su IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 i NF κ B-p65, uključenih u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima ispitanika pod uticajem terapije HBK. Aktivnost NF κ B-p65 regulisana je na nivou fosforilacije I κ B, proteina koji vezuje NF κ B, ali fosforilacije samog NF κ B-p65. Fosforilacija NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶ je važan mehanizam regulacije aktivnosti NF κ B-p65 putem I κ K α , obzirom da fosforilacija ovog transkripcionog faktora na Ser⁵³⁶ vodi smanjenju aktivnosti NF κ B-p65 (Lawrence i sar., 2005; Ghosh i sar., 2010). Takođe, fosforilacija NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶ NF κ B-p65 sprečava prelazak iz citoplazme u jedro i inhibira njegovo vezivanje za promotor gena u jedru leukocita, sprečavajući time transkripciju gena uključenih u inflamatorni proces, i smanjujući inflamaciju (Mattioli i sar., 2004; Saccani i sar., 2004; Lawrence i sar., 2005). Rezultati merenja ekspresije fosforilisanog NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶ i ukupnog NF κ B-p65, kao i određivanja njihovog odnosa, koji ukazuje na nivo aktivacije NF κ B-p65 u limfocitima ispitanika, pokazuju da je došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije fosforilisanog i ukupnog NF κ B-p65 (**Slika 15A.B.**) i povećanja njihovog odnosa u poređenju na vrednostima pre terapije (**Slika 15C.**). Povećanje odnosa fosforilisanog NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶ i ukupnog NF κ B-p65, odnosno fosforilacije NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶ ukazuje na smanjenu aktivnost NF κ B-p65 (Lawrence i sar., 2005; Ghosh i sar., 2010). Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora koji su takođe pokazali da tretman HBK inhibira ekspresiju i

aktivnost NFκB-p65 u plazmi i različitim ćelijama (Meng i sar., 2016; Sun i sar., 2019; Niu i sar., 2019). Polazeći od toga da je ekspresija iNOS, pre svega, regulisana na nivou transkripcije gena, moguće je da HBK inhibirajući aktivnost NFκB-p65, transkripcionog faktora koji se vezuje za promotor gena za iNOS, utiče i na smanjenje ekspresije iNOS u limfocitima obolelih od IDDM. Smanjenje ekspresije NFκB-p65 i iNOS zapaženo nakon terapije HBK u limfocitima ispitanika može se dovesti u vezu i sa inhibitornim efektom HBK na sintezu inflamatornih citokina koji su uključeni u aktivaciju NFκB-p65, što je potvrđeno i rezultatima drugih autora (Benson i sar., 2003; Ding i sar., 2018).

Literaturni podaci su pokazali da je u stanju DM i IR povećana fosforilacije IRS-1 na serinskimostacima usled visoke koncentracije SMK u plazmi, čime je smanjena mogućnost fosforilacije IRS-1 na tirozinskim ostacima, time se sprečava asocijacija IRS-1 sa receptorom za insulin, kao i asocijacija IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K (Dresner i sar., 1999; Birnbaum, 2001). Dalje će biti diskutovani rezultati koji su dobijeni merenjem ekspresije fosforilisanog IRS-1 na Ser³⁰⁷ i ukupnog IRS-1, kao i određivanjem njihovog odnosa u limfocitima ispitanika pod uticajem terapije HBK. Dobijeni rezultati pokazuju da je nakon terapije HBK u limfocitima pacijenata sa IDDM došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije fosforilisanog IRS-1 na Ser³⁰⁷, ukupnog IRS-1 (**Slika 16A.B.**) i njihovog odnosa, tj. fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ (**Slika 16C.**). Ovako dobijeni rezultat navodi na zaključak da je usled smanjenja fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ pod uticajem terapije HBK, aktivirana fosforilacija IRS-1 na tirozinskim ostacima. Moguće je da terapija HBK smanjujući koncentraciju SMK u serumu pacijenata sa IDDM dovodi do aktivacije IRS-1, ključnog molekula u signalnoj kaskadi kojom insulin ostvaruje svoje dejstvo na ćelije i tkiva (Saltiel i Kahn, 2001). Takođe je moguće i da smanjena ekspresija iNOS nakon terapije HBK doprinosi aktivaciji IRS-1, s obzirom na to da je pokazano da NO, poreklom od iNOS, reakcijama S-nitrozilacije i nitracije dovodi do posttranslacione modifikacije proteina kao što je IRS-1 i dovodi do njegove degradacije putem procesa ubikvitinacije (Sugita i sar., 2005). Takođe, inhibicija iNOS dovodi do fosforilacije IRS-1 na Tyr i time aktivira signalni put delovanja insulina, što dovodi do poboljšanja regulacije metabolizma glukoze u hepatocitima gojaznih miševa sa DM (Fujimoto i sar., 2005).

Sledeći u nizu molekula koji učestvuje u mehanizmu regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS je i PI3K (Korkmaz-Icöz i sar., 2017; Zafirovic i sar., 2019). Pokazano je da je aktivnost ove kinaze smanjena u stanju DM što može uticati na razvoj inflamacije i apoptoze ćelija (So i Fruman, 2012). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da je terapija HBK dovela do statistički značajnog povećanja ekspresije regulatorne p85 i

katalitičke subjedinice p110 PI3K u limfocitima ispitanika u odnosu na vrednosti izmerene pre terapije (**Slika 17A.B.**). Aktivacija PI3K pod uticajem terapije HBK dalje može podstaći sintezu kofaktora BH4 posredstvom enzima GTP ciklohidrolaze 1 (*GCHI*, engl. *GTP cyclohydrolase 1*), i na taj način omogućiti dimerizaciju iNOS (Sakai i sar., 2006), što ukazuje da PI3K ima važnu ulogu u post-transkripcionoj modifikaciji proteinskog produkta gena za iNOS. Dakle, dobijeni rezultati aktivacije PI3K kao i smanjenja ekspresije iNOS u limfocitima ispitanika ukazuju na to da PI3K najverovatnije nije uključena u mehanizam regulacije iNOS na nivou transkripcije pod uticajem terapije HBK. Rezultati dobijeni linearnom regresionom analizom pokazuju postojanje značajne pozitivne korelacije između nivoa PI3K-p85 u limfocitima i dokozapentaenoinske kiseline u plazmi ispitanika nakon terapije HBK (**Tabela 8.**). n-3 PUFA, među kojima su dokozapentaenoinska i dokozahexaenoinska kiseline, mogu smanjiti povrede izazvane ishemijom i reperfuzijom, tako što povećavaju stvaranje fosfatidilserina u membrani, koji podstiče vezivanje PIP3, produkta aktivirane PI3K kinaze, i PH domena Akt, što dovodi do aktivacije Akt (Huang i sar., 2011; Zhang i sar., 2015). Rezultati ove doktorske disertacije kao i rezultati drugih autora (Huang i sar., 2011; Zhang i sar., 2015) ukazuju na moguće učešće DPA u regulaciji ekspresije PI3K/Akt signalnog puta u limfocitima ispitanika pod uticajem terapije HBK.

Rezultati brojnih istraživanja su ukazali na učešće Akt kinaze u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS enzima (Hattori i sar., 2003; Gwinn i Vallyathan, 2006). Aktivacija Akt vodi fosforilaciji I κ K, koja omogućava proteolitičku degradaciju I κ B-NF κ B kompleksa, translokaciju NF κ B iz citoplazme u jedro i sledstvenu transkripciju i translaciju iNOS gena (Hattori i sar., 2003; Gwinn i Vallyathan, 2006). Postoje i podaci koji pokazuju da inhibicija Akt dovodi do supresije aktivnosti NF κ B i sledstvene inhibicije ekspresije iNOS (Hattori i sar., 2003). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je terapija HBK dovela do smanjenja ekspresije fosforilisane Akt na Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³, ukupne Akt (**Slika 18A.B. i 19A.B.**), fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ (**Slika 19C.**), kao i povećanja fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ (**Slika 18C.**) u limfocitima ispitanika u odnosu na nivoe pre početka terapije. Uzimajući u obzir da je za potpunu aktivaciju Akt, neophodna fosforilacija ove kinaze na Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³ ostacima, dobijeni rezultati ukazuju da terapija HBK dovodi do delimične fosforilacije, tj. delimične aktivacije Akt u limfocitima, što ukazuje da je aktivnost Akt kinaze u limfocitima ispitanika smanjena. Uzimajući u obzir da različite kinaze aktiviraju Akt, fosforilacijom na Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³ ostacima, nezavisno od aktivacije PI3K, moguće je da sama terapija HBK utiče na aktivaciju kinaza koje fosforilišu Akt na Thr³⁰⁸, kao što je PDK1 (Alessi i Cohen, 1998), dok inhibira kinaze koji dovode do fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³, među kojima su mTORC2, PDK2,

PIKK i DNA-PK (Sarbasov i sar., 2005; Sale i Sale, 2008). Ova pretpostavka može se delimično potvrditi rezultatima istraživanja Liu i saradnika koji su pokazali da HBK inhibira mTOR signalni put kod pacova sa razvijenim perifernim neuropatskim bolom, što rezultira izostankom fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ (Liu i sar., 2017; Liu i sar., 2019). S obzirom da je fosforilacija Akt na oba aminokiselinska ostatka neophodna za aktivaciju NFκB, moguće je da je nepotpuna fosforilacija Akt uzrok smanjene ekspresije i aktivnosti NFκB u limfocitima, a sledstveno i smanjene ekspresije iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM nakon terapije HBK. U prilog ovom objašnjenju idu i rezultati istraživanja Song i saradnika koji su pokazali da smanjena fosforilacija Akt na Ser⁴⁷³, izazvana primenom inhibitora, dovodi do smanjene fosforilacije IκBα, a time i smanjene aktivnosti NFκB kod miševa (Song i sar., 2008). Dobijeni rezultati ukazuju na učešće Akt kinaze u regulaciji ekspresije iNOS najverovatnije preko smanjene ekspresije NFκB-p65 u limfocitima ispitanika nakon terapije HBK.

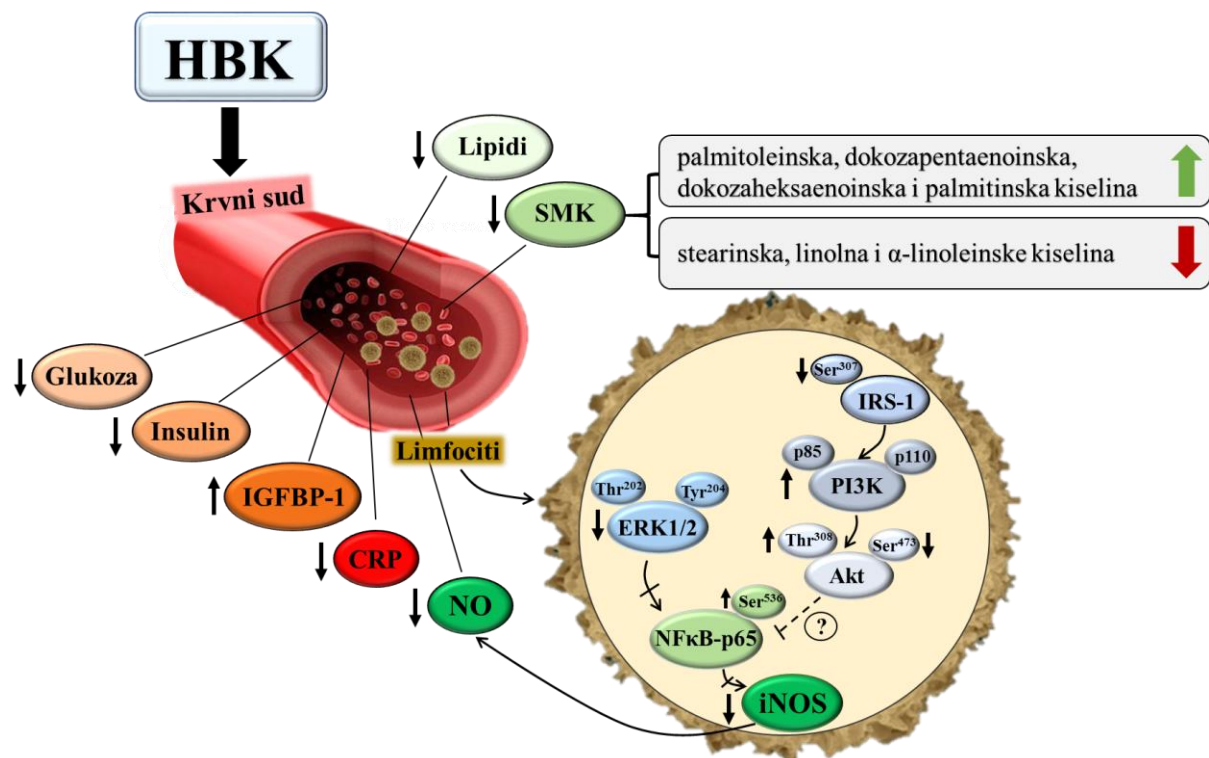
Rezultati prethodnih istraživanja naše laboratorije ukazala su na učešće ERK1/2 kinaze u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS kod gojaznih pacova sa IR (Sudar Milovanovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2017). Osim toga, pokazano je i da fosforilisana, tj. aktivirana ERK1/2 fosforiliše IκK i tako aktivira NFκB, on pokreće transkripciju gena za iNOS u stanju DM (Awazu i sar., 1999; Kang i sar., 1999; Hou i sar., 2009). Nasuprot tome, inhibicija fosforilacije ove kinaze smanjuje aktivnost NFκB izazvane citokinima i smanjuje ekspresiju gena za iNOS (Xu i sar., 2006). Rezultati ove doktorske teze pokazuju da je nakon terapije HBK došlo do značajnog smanjenja ekspresije fosforilisane ERK1/2 na Thr²⁰² i Tyr²⁰⁴, ukupne ERK1/2 (**Slika 20A.B.**), kao i njihovog odnosa tj. fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰² i Tyr²⁰⁴ (**Slika 20C.**) u limfocitima pacijenata sa IDDM u odnosu na vrednosti pre terapije. Na osnovu dobijenih rezultata, kao i podataka iz literature može se zaključiti da smanjena fosforilacija ERK nakon terapije HBK rezultira smanjenom ekspresijom i aktivnošću NFκB, kao i sledstvenom inhibicijom ekspresije i aktivnosti iNOS (Jiang i sar., 2004; Niu i sar., 2013).

Poznato je da IGFBP-1 ima važnu ulogu u metabolizmu lipida i glukoze, i da promene u ekspresiji ovog proteina koji vezuje IGF-1, mogu ukazivati na poremećaj metabolizma i pojavu vaskularnih komplikacija u stanju IDDM (Kang i sar., 2005; Aryan i sar., 2018). Neadekvatna kontrola glikemije i godine života kod dijabetičara vode sve većem porastu koncentracije IGFBP-1 u cirkulaciji (Aydin i sar., 2013). Intenzivnim pregledom literature nije pronađen ni jedan rad koji se odnosi na uticaj HBK na ekspresiju IGFBP-1 u serumu, stoga su dalja istraživanja bila usmerena na odgovor na pitanje: Da li terapija HBK utiče na ekspresiju IGFBP-1 u serumu ispitanika? Rezultati pokazuju da je nakon terapije

HBK došlo do značajnog povećanja ekspresije IGFBP-1 u serumu ispitanika (**Slika 21**). Polazeći od saznanja da na regulaciju nivoa IGFBP-1 u cirkulaciji mogu uticati brojni hormoni, među kojima su insulin i hormon rasta, kao i inflamatorni citokini, ishrana itd., moguće je da terapija HBK ostvaruje uticaj na ekspresiju IGFBP-1, posredno preko uticaja na smanjenje koncentracije insulina. Hormon insulin je važan regulator ekspresije IGFBP-1 u jetri, i u visokoj koncentraciji inhibira transkripciju gena za IGFBP-1 i tako smanjuje njegovu koncentraciju u krvi (Orlowski i sar., 1991). Smanjenje koncentracije insulina u serumu ispitanika uočeno nakon terapija HBK može se dovesti u vezu sa povećanjem ekspresije IGFBP-1 u serumu. Iako je u literaturi pokazano da terapija HBK ostvaruje povoljan uticaj na obolele sa IDDM, tako što smanjuje komplikacije nastale usled neadekvatne kontrole glikemije, dobijeni rezultati povećanog nivoa IGFBP-1 posle terapije HBK ukazuju na nizak nivo IGF-1, čak i nakon uspostavljanja adekvatne kontrole glikemije (van Dijk i sar., 2014). Važno je, takođe, istaknuti da dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju rane efekte terapije HBK i stoga je teško prevideti da li bi korekcija ili ponavljanje terapije HBK moglo da dovede do izmena u ekspresiji IGFBP-1 u serumu ispitanika. Izostanak studija koje ispituju efekat HBK na ekspresiju IGFBP-1 i prijavljeni suprotni efekti visoke koncentracije IGFBP-1 na razvoj vaskularnih komplikacija u stanju DM (Barzilay i sar., 2001), zahtevaju sprovođenje dodatnih istraživanja kako bi se ispitali rani i kasni efekti HBK na pacijente sa IDDM.

Uzimajući u obzir sve rezultate ove doktorske disertacije predložen je mehanizam kojim terapija ostvaruje antiinflamatorne efekte i potencijalno smanjuje vaskularne komplikacije kod pacijenata sa IDDM (**Slika 22**). Terapija HBK smanjuje koncentraciju glukoze, insulina, CRP, lipida, i ukupne SMK u krvi i pojedinačnih SMK, kao što su stearinska, linolna i α -linoleinska kiseline. Sa druge strane terapija povećava nivo dokozapentaenoinske, dokozaheksaenoinske, palmitoleinske i palmitinske kiseline u plazmi ispitanika, što bi moglo da inhibira ekspresiju iNOS na nivou transkripcije i tako spreči dalji razvoj inflamacije i vaskularnih komplikacija. Inhibicija ekspresije i aktivnosti iNOS može biti ostvarena pod uticajem različitih signalnih kaskada u kojima učestvuju IRS-1, PI3K i Akt sa jedne strane i ERK1/2 sa druge strane (Kim i Kim, 2005; Zafirovic i sar., 2019). Aktivacija Akt i ERK1/2 neophodna je za aktivaciju NF κ B i sledstvenu transkripciju gena za iNOS (Zhao i Lee, 1999; Dong Bai i sar., 2009). HBK terapija uzrokuje aktivaciju IRS-1 i PI3K, ali i delimičnu aktivaciju Akt usled izostanka fosforilacije na Ser⁴⁷³, što rezultira smanjenju ekspresije NF κ B-p65 u limfocitima. Uzrok smanjene ekspresije NF κ B-p65 je smanjena ekspresija ERK1/2 pod uticajem terapije HBK, ali i povećane fosforilacije NF κ B-p65 na

Ser⁵³⁶, što sprečava prelazak ovog transkripcionog faktora u jedro i inobira njegovo vezivanje za promotor gena za iNOS, i sledstvenog smanjenja ekspresije ovog gena.



Slika 22. Uticaj terapije HBK na parametre metabolizma glukoze i masti, kao i markera inflamacije i molekularni mehanizmi regulacije ekspresije iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM i vaskularnim komplikacijama

HBK- kiseonik pod hiperbaričnim uslovima; SMK- slobodne masne kiseline; IGFBP-1- protein koji vezuje faktor rasta sličan insulinu 1; CRP- C-reaktivni protein; NO- azot-monoksid; IRS-1- supstrat receptora za insulin 1; PI3K- fosfatidilinozitol 3 kinaza; Akt- protein kinaza B; ERK1/2- kinaza regulisana vanćelijskim signalima 1 i 2; NFκB-p65- p65 subjedinica nuklearnog faktora kappa B; iNOS- inducibilna azot-monoksid-sintaza

7. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci. Terapija HBK u trajanju od 10 tretmana kod pacijenata sa IDDM i vaskularnim komplikacijama dovodi do:

1. smanjenja koncentracije glukoze i insulina u serumu,
2. smanjenja koncentracije ukupnog holesterola, holesterola bez HDL, Tg i LDL u plazmi, kao i rizika za razvoj ateroskleroze,
3. smanjenja koncentracije ukupnih SMK u plazmi i nivoa pojedinačnih SMK, kao što su: stearinska, linolna i α -linoleinske kiseline, i povećanja nivoa dokozaheksaenoinske, dokozaheksaenoinske, palmitoleinske i palmitinske kiseline u plazmi,
4. smanjenja markera inflamacije CRP i NO u serumu,
5. smanjenja ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima,
6. smanjenja ekspresije transkripcionog faktora NF κ B-p65, ekspresije i fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷, ekspresije i fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³, ekspresije i fosforilacije na ERK1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, kao i povećanja fosforilacije NF κ B-p65 na Ser⁵³⁶, ekspresije subjedinica p85 i p110 PI3K i fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ u limfocitima, i
7. povećanja ekspresije IGFBP-1 u serumu.

Dobijeni i prikazani rezultati pokazuju da terapija HBK smanjuje koncentraciju parametara metabolizma glukoze i masti, kao i markera inflamacije u krvi pacijenata sa IDDM, čime ostvaruje povoljne efekte na obolele od IDDM. Terapija HBK ostvaruje antiinflamatorne i antiaterogene efekte mehanizmom koji uključuje smanjenje nivoa stearinske, linolne kiseline i α -linoleinske kiseline, kao i povećanje nivoa palmitinske,

palmitoleinske, dokozapentaenoinske i dokozaheksaenoinske kiseline u plazmi. Antiinflamatornom svojstvu HBK doprinosi inhibicija aktivnosti NFκB-p65, smanjenje ekspresije i aktivnosti iNOS, posredstvom delimične aktivacije Akt i smanjene aktivacije ERK1/2 u limfocitima pacijenata sa IDDM. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da terapija HBK ima značajno antiinflamatorno i antiaterogeno dejstvo na obolele od IDDM, i da na taj način posredno doprinesi dodatnom smanjenju vaskularnih komplikacija. Istraživanja ove doktorske disertacije predstavljaju značajan doprinos razumevanju molekularnih mehanizama kojima terapija HBK utiče na promenu nivoa i sastava MK u plazmi, i regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u limfocitima pacijenata sa IDDM, što je od izuzetne važnosti za razvoj efikasnijih strategija u lečenju vaskularnih komplikacija kod pacijenata sa IDDM.

8. Literatura

1. Abel, J. J. (1926). "Crystalline Insulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 12(2): 132-136.
2. Aboyans, V., Ricco, J. B., Bartelink, M. E. L., Bjorck, M., Brodmann, M., Cohnert, T., Collet, J. P., Czerny, M., De Carlo, M., Debus, S., et al. (2018). "2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO)The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS)." *Eur Heart J* 39(9):763-816.
3. Ackah, E., Yu, J., Zoellner, S., Iwakiri, Y., Skurk, C., Shibata, R., Ouchi, N., Easton, R. M., Galasso, G., Birnbaum, M. J., et al. (2005). "Akt1/protein kinase B α is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis." *J Clin Invest* 115(8): 2119-2127.
4. Adela, R., Nethi, S. K., Bagul, P. K., Barui, A. K., Mattapally, S., Kuncha, M., Patra, C. R., Reddy, P. N. and Banerjee, S. K. (2015). "Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients." *PLoS One* 10(4) e0125270.
5. Agostoni, C. and Bruzzese, M. G. (1992). "Fatty acids: their biochemical and functional classification." *Pediatr Med Chir* 14(5): 473-479.
6. Aktan, F. (2004). "iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation." *Life Sci* 75(6): 639-653.
7. Al-Kateb, H., Boright, A. P., Mirea, L., Xie, X., Sutradhar, R., Mowjoodi, A., Bharaj, B., Liu, M., Bucksa, J. M., Arends, V. L., et al. (2008). "Multiple

- superoxide dismutase 1/splicing factor serine alanine 15 variants are associated with the development and progression of diabetic nephropathy: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Genetics study." *Diabetes* 57(1): 218-228.
8. Al-Waili, N. S. and Butler, G. J. (2006). "Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action." *Sci World J* 3(6): 425-441.
 9. Albert, C. M., Campos, H., Stampfer, M. J., Ridker, P. M., Manson, J. E., Willett, W. C. and Ma, J. (2002). "Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death." *N Engl J Med* 346(15): 1113-1118.
 10. Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* 357(Pt 3): 593-615.
 11. Alessi, D. R. and Cohen, P. (1998). "Mechanism of activation and function of protein kinase B." *Curr Opin Genet Dev* 8(1): 55-62.
 12. Alfon, J., Guasch, J. F., Berrozpe, M. and Badimon, L. (1999). "Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors." *Atherosclerosis* 145(2): 325-331.
 13. American Chemical Society (1960). "Definitive Rules for Nomenclature of Organic Chemistry." *J Am Chem Soc* 82(21): 5545-5574.
 14. American Diabetes Association (2010). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes Care* 33 Suppl 1: S62-9.
 15. Andersen, A. R., Christiansen, J. S., Andersen, J. K., Kreiner, S. and Deckert, T. (1983). "Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study." *Diabetologia* 25(6): 496-501.
 16. Andjelkovic, M., Maira, S. M., Cron, P., Parker, P. J. and Hemmings, B. A. (1999). "Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase." *Mol Cell Biol* 19(7): 5061-5072.
 17. Ansari, K. A., Wilson, M., Slater, G. E., Haglin, J. J. and Kaplan, E. (1986). "Hyperbaric oxygenation and erythrocyte antioxidant enzymes in multiple sclerosis patients." *Acta Neurol Scand* 74(2).

18. ARIC Study Investigators (2003). "Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." *Am J Clin Nutr* 78(1): 91-98.
19. Arthur, M. J. (1988). "Reactive oxygen intermediates and liver injury." *J Hepatol* 6(1): 125-131.
20. Aryan, Z., Ghajar, A., Faghihi-Kashani, S., Afarideh, M., Nakhjavani, M. and Esteghamati, A. (2018). "Baseline High-Sensitivity C-Reactive Protein Predicts Macrovascular and Microvascular Complications of Type 2 Diabetes: A Population-Based Study." *Ann Nutr Metab* 72(4): 287-295.
21. Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y., et al. (2007). "Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1." *Cell Signal* 19(3): 519-527.
22. Asarian, L. and Geary, N. (2002). "Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats." *Horm Behav* 42(4): 461-471.
23. Assmann, T. S., Brondani, L. A., Boucas, A. P., Rheinheimer, J., de Souza, B. M., Canani, L. H., Bauer, A. C. and Crispim, D. (2016). "Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis." *Nitric Oxide* 61: 1-9.
24. Atkinson, M. A. and Maclaren, N. K. (1994). "The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus." *N Engl J Med* 331(21): 69-82.
25. Avruch, J. (1998). "Insulin signal transduction through protein kinase cascades." *Mol Cell Biochem* 182(1-2): 31-48.
26. Awada, M., Soulage, C. O., Meynier, A., Debard, C., Plaisancié, P., Benoit, B., Picard, G., Loizon, E., Chauvin, M.-A., Estienne, M., et al. (2012). "Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells." *J Lipid Res* 53(10): 2069-2080.
27. Awazu, M., Ishikura, K., Hida, M. and Hoshiya, M. (1999). "Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes." *J Am Soc Nephrol* 10(4): 738-745.

28. Aydin, F., Kaya, A., Karapinar, L., Kumbaraci, M., Imerci, A., Karapinar, H., Karakuzu, C. and Incesu, M. (2013). "IGF-1 Increases with Hyperbaric Oxygen Therapy and Promotes Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers." *J Diabetes Res* 2013: 567834.
29. Bach, L. A. (2018). "40 years of IGF1: IGF-binding proteins." *J Mol Endocrinol* 61(1): T11-T28.
30. Bae, J.-H., Song, D.-K. and Im, S.-S. (2013). "Regulation of IGF1BP-1 in Metabolic Diseases." *J Lifestyle Med* 3(2): 73-79.
31. Baek, K. J., Thiel, B. A., Lucas, S. and Stuehr, D. J. (1993). "Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme." *J Biol Chem* 268(28): 21120-21129.
32. Barma, P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Kundu, R., Dasgupta, S., Biswas, A., Bhattacharya, S., Roy, S. S. and Bhattacharya, S. (2009). "Lipid induced overexpression of NF- κ B in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance." *Biochim Biophys Acta* 1792(3): 190-200.
33. Barzilay, J. I., Abraham, L., Heckbert, S. R., Cushman, M., Kuller, L. H., Resnick, H. E. and Tracy, R. P. (2001). "The Relation of Markers of Inflammation to the Development of Glucose Disorders in the Elderly." *The Cardiovascular Health Study. Diabetes* 50(10): 2384-2389.
34. Basta, G., Schmidt, A. M. and De Caterina, R. (2004). "Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes." *Cardiovasc Res* 63(4): 582-592.
35. Behr-Roussel, D., Rupin, A., Sansilvestri-Morel, P., Fabiani, J. N. and Verbeuren, T. J. (2000). "Histochemical evidence for inducible nitric oxide synthase in advanced but non-ruptured human atherosclerotic carotid arteries." *Histochem J* 32(1): 41-51.
36. Benoit, S. C., Kemp, C. J., Elias, C. F., Abplanalp, W., Herman, J. P., Migrenne, S., Lefevre, A.-L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., et al. (2009). "Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents." *J Clin Invest* 119(9): 2577-2589.

37. Benson, R. M., Minter, L. M., Osborne, B. A. and Granowitz, E. V. (2003). "Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages." *Clin Exp Immunol* 134(1): 57-62.
38. Bereket, A., Lang, C. H. and Wilson, T. A. (1999). "Alterations in the growth hormone-insulin-like growth factor axis in insulin dependent diabetes mellitus." *Horm Metab Res* 31(2-3): 172-181.
39. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002). "Fatty Acids Are Synthesized and Degraded by Different Pathways." *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York.
40. Bian, H., Hu, Q., Liang, X., Chen, D., Li, B., Tang, J. and Zhang, J. H. (2015). "Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates hemorrhagic transformation through increasing PPARgamma in hyperglycemic MCAO rats." *Exp Neurol* 265: 22-29.
41. Biden, T. J. and Taylor, K. W. (1983). "Effects of ketone bodies on insulin release and islet-cell metabolism in the rat." *Biochem J* 212(2): 371-377.
42. Birnbaum, M. J. (2001). "Turning down insulin signaling." *J Clin Invest* 108(5): 655-9.
43. Blakytyny, R., Jude, E. B., Martin Gibson, J., Boulton, A. J. and Ferguson, M. W. (2000). "Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers." *J Pathol* 190(5): 589-594.
44. Bloch-Damti, A. and Bashan, N. (2005). "Proposed Mechanisms for the Induction of Insulin Resistance by Oxidative Stress." *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1553-1567.
45. Blumer, K. J. and Johnson, G. L. (1994). "Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways." *Trends Biochem Sci* 19(6): 236-240.
46. Bodanapally, U. K., Shanmuganathan, K., Boscak, A. R., Jaffray, P. M., Van der Byl, G., Roy, A. K., Dreizin, D., Fleiter, T. R., Mirvis, S. E., Krejza, J., et al. (2014). "Vascular complications of penetrating brain injury: comparison of helical CT angiography and conventional angiography." *J Neurosurg* 121(5): 1275-1283.

47. Boden, G. (2003). "Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111(3): 121-124.
48. Boden, G. (1999). "Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus." *Proc Assoc Am Physicians* 111(3): 241-248.
49. Boden, G. and Chen, X. (1999). "Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes." *Diabetes* 48(3): 577-583.
50. Bogdan, C., Rollingshoff, M. and Diefenbach, A. (2000). "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity." *Curr Opin Immunol* 12(1): 64-76.
51. Boni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D. T., Prazak, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Ehses, J. A., Schuit, F. C., et al. (2009). "Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I." *Endocrinology* 150(12): 4065-4074.
52. Boni-Schnetzler, M., Thorne, J., Parnaud, G., Marselli, L., Ehses, J. A., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Halban, P. A., Weir, G. C. and Donath, M. Y. (2008). "Increased interleukin (IL)-1beta messenger ribonucleic acid expression in beta - cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1beta in human islets by glucose and autostimulation." *J Clin Endocrinol Metab* 93(10): 5218-5229.
53. Borkman, M., Storlien, L. H., Pan, D. A., Jenkins, A. B., Chisholm, D. J. and Campbell, L. V. (1993). "The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids." *N Engl J Med* 328(4): 238-244.
54. Boykin, J. V., Jr. and Baylis, C. (2007). "Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study." *Adv Skin Wound Care* 20(7): 382-388.
55. Boyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77-89.

56. Bradfield, J. P., Qu, H. Q., Wang, K., Zhang, H., Sleiman, P. M., Kim, C. E., Mentch, F. D., Qiu, H., Glessner, J. T., Thomas, K. A., et al. (2011). "A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci." *PLoS Genet* 7(9): e1002293.
57. Brenner, R. R. (2003). "Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68(2): 151-162.
58. Briggs, M. A., Petersen, K. S. and Kris-Etherton, P. M. (2017). "Saturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Replacements for Saturated Fat to Reduce Cardiovascular Risk." *Healthcare (Basel, Switzerland)* 5(2): 29.
59. Brown, O. R., Howitt, H. F., Stees, J. L. and Platner, W. S. (1971). "Effects of hyperoxia on composition and rate of synthesis of fatty acids in *Escherichia coli*." *J Lipid Res* 12(6): 692-698.
60. Bruce, J. S. and Salter, A. M. (1996). "Metabolic fate of oleic acid, palmitic acid and stearic acid in cultured hamster hepatocytes." *Biochem J* 316 (Pt 3): 847-852.
61. Bulayeva, N. N., Gametchu, B. and Watson, C. S. (2004). "Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways." *Steroids* 69(3): 181-192.
62. Bunn, H. F., Haney, D. N., Kamin, S., Gabbay, K. H. and Gallop, P. M. (1976). "The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo." *J Clin Invest* 57(6): 1652-1659.
63. Butler, F. K., Jr., Hagan, C. and Murphy-Lavoie, H. (2008). "Hyperbaric oxygen therapy and the eye." *Undersea Hyperb Med* 35(5): 333-387.
64. Buttery, L. D., Springall, D. R., Chester, A. H., Evans, T. J., Standfield, E. N., Parums, D. V., Yacoub, M. H. and Polak, J. M. (1996). "Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite." *Lab Invest* 75(1): 77-85.
65. Calder, P. C. and Grimble, R. F. (2002). "Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity." *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S14-9.
66. Cano, E. and Mahadevan, L. C. (1995). "Parallel signal processing among mammalian MAPKs." *Trends Biochem Sci* 20(3): 117-122.

67. Cantrell, D. A. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways." *J Cell Sci* 114(Pt 8): 1439-1445.
68. Cao, J., Schwichtenberg, K. A., Hanson, N. Q. and Tsai, M. Y. (2006). "Incorporation and Clearance of Omega-3 Fatty Acids in Erythrocyte Membranes and Plasma Phospholipids." *Clin Chem* 52(12): 2265-2272.
69. Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Hirabara, S. M., Seabra, A. B., Carvalheira, J. B., de Oliveira, M. G., Velloso, L. A., Curi, R. and Saad, M. J. (2005). "S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance." *Diabetes* 54(4): 959-967.
70. Castanon, M. M., Lauricella, A. M., Kordich, L. and Quintana, I. (2007). "Plasma homocysteine cutoff values for venous thrombosis." *Clin Chem Lab Med* 45(2): 232-236.
71. Castro-Correia, C., Sousa, S., Norberto, S., Matos, C., Domingues, V. F., Fontoura, M. and Calhau, C. (2017). "The Fatty Acid Profile in Patients with Newly Diagnosed Diabetes: Why It Could Be Unsuspected." *Int J Pediatr* 2017: 6424186.
72. Ceolotto, G., Gallo, A., Sartori, M., Valente, R., Baritono, E., Semplicini, A. and Avogaro, A. (2001). "Hyperglycemia Acutely Increases Monocyte Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in Vivo in Humans." *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 1301-1305.
73. Chang, W., Hatch, G. M., Wang, Y., Yu, F. and Wang, M. (2019). "The relationship between phospholipids and insulin resistance: From clinical to experimental studies." *J Cell Mol Med* 23(2): 702-771.
74. Charparro, R. J., Konigshofer, Y., Beilhack, G. F., Shizuru, J. A., McDevitt, H. O. and Chien, Y.-h. (2006). "Nonobese diabetic mice express aspects of both type 1 and type 2 diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12475-12480.
75. Charbonneau, A. and Marette, A. (2010). "Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins." *Diabetes* 59(4): 861-871.
76. Chartrain, N. A., Geller, D. A., Koty, P. P., Sitrin, N. F., Nussler, A. K., Hoffman, E. P., Billiar, T. R., Hutchinson, N. I. and Mudgett, J. S. (1994).

- "Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene." *J Biol Chem* 269(9): 6765-6772.
77. Chawla, A., Chawla, R. and Jaggi, S. (2016). "Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?" *Indian J Endocrinol Metab* 20(4): 546-551.
78. Chen, C. Y., Wu, R. W., Hsu, M. C., Hsieh, C. J. and Chou, M. C. (2017). "Adjunctive Hyperbaric Oxygen Therapy for Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Controlled Trial." *J Wound Ostomy Continence Nurs* 44(6): 536-545.
79. Chen, K., Pittman, R. N. and Popel, A. S. (2008). "Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective." *Antioxid Redox Signal* 10(7): 1185-1198.
80. Chen, Y. W., Wang, Y. Y., Zhao, D., Yu, C. G., Xin, Z., Cao, X., Shi, J., Yang, G. R., Yuan, M. X. and Yang, J. K. (2015). "High prevalence of lower extremity peripheral artery disease in type 2 diabetes patients with proliferative diabetic retinopathy." *PLoS One* 10(3): e0122022.
81. Chi, Q. and Huang, K. (2007). "Identification of the nitration site of insulin by peroxynitrite." *J Pept Sci* 13(3): 149-153.
82. Chiarelli, F., Cipollone, F., Romano, F., Tumini, S., Costantini, F., di Ricco, L., Pomilio, M., Pierdomenico, S. D., Marini, M., Cucurullo, F., et al. (2000). "Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration." *Diabetes* 49(7): 1258-1263.
83. Chuang, L.-T., Glew, R. H., Li, C.-C., VanderJagt, D. J., Broyles, J. S., Ray, G. M. and Shah, V. O. (2012). "Comparison of the fatty acid composition of the serum phospholipids of controls, prediabetics and adults with type 2 diabetes." *J Diabetes Mellitus* 2(4): 393-401.
84. Calder, P. C. (2005). " Polyunsaturated fatty acids and inflammation. " *Biochem Soc Trans* 33(Pt 2):423-427.
85. Clark, M., Kroger, C. J. and Tisch, R. M. (2017). "Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response." *Front Immunol* 8: 1898.

86. Cleland, S. J., Fisher, B. M., Colhoun, H. M., Sattar, N. and Petrie, J. R. (2013). "Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks?" *Diabetologia* 56(7): 1462-1470.
87. Coggins Matthew, P. and Bloch Kenneth, D. (2007). "Nitric Oxide in the Pulmonary Vasculature." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(9): 1877-1885.
88. Corbett, J. A., Mikhael, A., Shimizu, J., Frederick, K., Misko, T. P., McDaniel, M. L., Kanagawa, O. and Unanue, E. R. (1993). "Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine-sensitive and -resistant stages in the immunological diabetic process." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 8992-8995.
89. Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. and Modolell, M. (1994). "Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod." *J Immunol Methods* 174(1-2): 231-235.
90. Costabile, M., Hii, C. S., Melino, M., Easton, C. and Ferrante, A. (2005). "The immunomodulatory effects of novel beta-oxa, beta-thia, and gamma-thia polyunsaturated fatty acids on human T lymphocyte proliferation, cytokine production, and activation of protein kinase C and MAPKs." *J Immunol* 174(1): 233-243.
91. Creager Mark, A., Lüscher Thomas, F., null, n., Cosentino, F. and Beckman Joshua, A. (2003). "Diabetes and Vascular Disease." *Circulation* 108(12): 1527-1532.
92. Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Di Paola, R., Caputi, A. P. and Salvemini, D. (2004). "Superoxide: a key player in hypertension." *Faseb J* 18(1): 94-101.
93. Dan, H. C., Cooper, M. J., Cogswell, P. C., Duncan, J. A., Ting, J. P. and Baldwin, A. S. (2008). "Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK." *Genes Dev* 22(11): 1490-1500.
94. Dong Bai, Ueno, L, and Vogt, P.K. (2009). " Akt-mediated regulation of NF κ B and the essentialness of NF κ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. " *Int J Cancer* 125(12): 2863–2870.
95. Dandona, P., Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Assian, E. and Ahmad, S. (2001). "Insulin inhibits intranuclear nuclear factor κ B and

- stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?" *J Clin Endocrinol Metab* 86(7): 3257-3265.
96. Das, U. N. (2006). "Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology." *Biotechnol J* 1(4): 420-439.
 97. Davidson, E. A., Pickens, C. A. and Fenton, J. I. (2018). "Increasing dietary EPA and DHA influence estimated fatty acid desaturase activity in systemic organs which is reflected in the red blood cell in mice." 69(2): 183-191.
 98. Dayal, S., Blokhin, I. O., Erger, R. A., Jensen, M., Arning, E., Stevens, J. W., Bottiglieri, T., Faraci, F. M. and Lentz, S. R. (2014). "Protective vascular and cardiac effects of inducible nitric oxide synthase in mice with hyperhomocysteinemia." *PLoS One* 9(9): e107734.
 99. DCCT/EDIC (2002). "Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus." *Jama*, 287: 2563-2569.
 100. De Caterina, R., Madonna, R., Bertolotto, A. and Schmidt, E. B. (2007). "n-3 Fatty Acids in the Treatment of Diabetic Patients: biological rationale and clinical data." *Diabetes Care* 30(4): 1012-1026.
 101. De Fea, K. and Roth, R. A. (1997). "Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 272(50): 31400-31406.
 102. de Lima, T. M., de Sa Lima, L., Scavone, C. and Curi, R. (2006). "Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages." *FEBS Letters* 580(13): 3287-3295.
 103. Debbabi, H., Uzan, L., Safar, M., Levy, B. I., Tibiriçà, E. and Mourad, J. J. (2006). "Increased Skin Capillary Density in Treated Essential Hypertensive Patients." *Am J Hypertens* 19(5): 477-83.
 104. Delaney, C. A., Tyrberg, B., Bouwens, L., Vaghef, H., Hellman, B. and Eizirik, D. L. (1996). "Sensitivity of human pancreatic islets to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death." *FEBS Lett* 394(3): 300-306.
 105. Dellamea, B. S., Leitão, C. B., Friedman, R. and Canani, L. H. (2014). "Nitric oxide system and diabetic nephropathy." *Diabetol Metab Syndr* 6(1): 17.

106. Despres, J. P., Lemieux, I., Dagenais, G. R., Cantin, B. and Lamarche, B. (2000). "HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study." *Atherosclerosis* 153(2): 263-272.
107. Dewailly, E., Blanchet, C., Gingras, S., Lemieux, S. and Holub, B. J. (2003). "Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Quebec (Canada)." *Lipids* 38(4): 359-365.
108. Di Pietro, N., Di Tomo, P., Di Silvestre, S., Giardinelli, A., Pipino, C., Morabito, C., Formoso, G., Mariggio, M. A. and Pandolfi, A. (2013). "Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIdelta(2))." *Atherosclerosis* 226(1): 88-94.
109. Ding, Y., Yao, P., Hong, T., Li, H., Zhu, Y., Han, Z. and Zhou, G. (2018). "The analgesic effect of early hyperbaric oxygen treatment in chronic constriction injury rats and its influence on nNOS and iNOS expression and inflammatory factor production." *Mol Pain* 14: 1744806918765837.
110. Dobiasova, M. (2006). "[AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice]." *Vnitr Lek* 52(1): 64-71.
111. Dobrzyn, A. and Ntambi, J. M. (2004). "The Role of Stearoyl-CoA Desaturase in Body Weight Regulation." *Trends Cardiovasc Med* 14(2): 77-81.
112. Dokken, B. B., Saengsirisuwan, V., Kim, J. S., Teachey, M. K. and Henriksen, E. J. (2008). "Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: Role of glycogen synthase kinase-3." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(3): E615-621.
113. Domachevsky, L., Keynan, Y., Militianu, D., Goldenberg, I. and Adir, Y. (2004). "Transient osteoporosis associated with hyperhomocystinemia: a possible role for hyperbaric oxygen therapy." *Undersea Hyperb Med* 31(3): 275-279.
114. Donaldson, W. E. (1979). "Regulation of fatty acid synthesis." *Fed Proc* 38(12): 2617-2621.
115. Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 262-267.

116. Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., et al. (1999). "Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Clin Invest* 103(2): 253-259.
117. Droyvold, W. B., Midthjell, K., Nilsen, T. I. and Holmen, J. (2005). "Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study." *Int J Obes (Lond)* 29(6): 650-655.
118. DuBose, S. N., Hermann, J. M., Tamborlane, W. V., Beck, R. W., Dost, A., DiMeglio, L. A., Schwab, K. O., Holl, R. W., Hofer, S. E. and Maahs, D. M. (2015). "Obesity in Youth with Type 1 Diabetes in Germany, Austria, and the United States." *J Pediatr* 167(3): 627-632.
119. Duncan, B. B., Schmidt, M. I., Pankow, J. S., Ballantyne, C. M., Couper, D., Vigo, A., Hoogeveen, R., Folsom, A. R. and Heiss, G. (2003). "Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study." *Diabetes* 52(7): 1799-805.
120. Duncombe, W. G. (1964). "The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma." *Clin Chim Acta* 9: 122-125.
121. Eikelboom, J. W., Hankey, G. J., Anand, S. S., Lofthouse, E., Staples, N. and Baker, R. I. (2000). "Association between high homocyst(e)ine and ischemic stroke due to large- and small-artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke." *Stroke* 31(5): 1069-1075.
122. Eisenbarth, G. S. (1986). "Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease." *N Engl J Med* 314(21): 1360-1368.
123. Eizirik, D. L., Delaney, C. A., Green, M. H., Cunningham, J. M., Thorpe, J. R., Pipeleers, D. G., Hellerstrom, C. and Green, I. C. (1996). "Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets." *Mol Cell Endocrinol* 118(1-2): 71-83.
124. Eizirik, D. L., Flodstrom, M., Karlens, A. E. and Welsh, N. (1996). "The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells." *Diabetologia* 39(8): 875-890.
125. Eizirik, D. L., Sandler, S., Welsh, N., Cetkovic-Cvrlje, M., Nieman, A., Geller, D. A., Pipeleers, D. G., Bendtzen, K. and Hellerstrom, C. (1994). "Cytokines

- suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation." *J Clin Invest* 93(5): 1968-1974.
126. El Gawad, S. S. A., Yossof, M. M., Wafa Soliman, A. A., Abd El-Aziz, A. A., El-Shahat, F. B. and Selim, A. K. (2011). "Expression of inducible nitric oxide synthase gene in diabetic and non-diabetic coronary artery disease patients." *Researcher* 3(6): 40-48.
127. Erkkila, A., de Mello, V. D., Riserus, U. and Laaksonen, D. E. (2008). "Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach." *Prog Lipid Res* 47(3): 172-187.
128. Erkkila, A. T., Lichtenstein, A. H., Mozaffarian, D. and Herrington, D. M. (2004). "Fish intake is associated with a reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease." *Am J Clin Nutr* 80(3): 626-632.
129. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. and Grodsky, G. M. (2003). "Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?" *Diabetes* 52(1): 1-8.
130. Falasca, M., Hughes, W. E., Dominguez, V., Sala, G., Fostira, F., Fang, M. Q., Cazzolli, R., Shepherd, P. R., James, D. E. and Maffucci, T. (2007). "The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling." *J Biol Chem* 282(38): 28226-28236.
131. Faleo, G., Fotino, C., Bocca, N., Molano, R. D., Zahr-Akrawi, E., Molina, J., Villate, S., Umland, O., Skyler, J. S., Bayer, A. L., et al. (2012). "Prevention of autoimmune diabetes and induction of β -cell proliferation in NOD mice by hyperbaric oxygen therapy." *Diabetes* 61(7): 1769-1778.
132. Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., Usellini, L., Nano, R., Bonini, P., Bertuzzi, F., et al. (2001). "High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program." *Diabetes* 50(6): 1290-1301.
133. Feng, C. (2012). "Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions." *Coord Chem Rev* 256(3-4): 393-411.

134. Festa, A., D'Agostino, R., Jr., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R. P. and Haffner, S. M. (2000). "Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)." *Circulation* 102(1): 42-47.
135. Floegel, A., Stefan, N., Yu, Z., Mühlenbruch, K., Drogan, D., Joost, H.-G., Fritsche, A., Häring, H.-U., Hrabě de Angelis, M., Peters, A., et al. (2013). "Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach." *Diabetes* 62(2): :639-648.
136. Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S. (1972). "Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge." *Clin Chem* 18(6): 499-502.
137. Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H. (2000). "Stimulation of insulin-like growth factor binding protein-1 synthesis by interleukin-1beta: requirement of the mitogen-activated protein kinase pathway." *Endocrinology* 141(9): 3156-3164.
138. Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A., Ueki, K. and Kaneki, M. (2005). "A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice." *Diabetes* 54(5): 1340-1348.
139. Fujita, S., Rasmussen, B. B., Cadenas, J. G., Grady, J. J. and Volpi, E. (2006). "Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(4): E745-754.
140. Fuller, J. H., Stevens, L. K. and Wang, S. L. (2001). "Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes." *Diabetologia* 44 Suppl 2: S54-64.
141. Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M. J. and Ye, J. (2002). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex." *J Biol Chem* 277(50): 48115-48121.
142. Gardner, C. D., Eguchi, S., Reynolds, C. M., Eguchi, K., Frank, G. D. and Motley, E. D. (2003). "Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells." *Exp Biol Med* 228(7): 836-842.

143. Gavin, J. R. (1998). "New classification and diagnostic criteria for diabetes mellitus." *Clin Cornerstone* 1(3): 1-12.
144. Geller, D. A., de Vera, M. E., Russell, D. A., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Simmons, R. L. and Billiar, T. R. (1995). "A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis." *J Immunol* 155(10): 4890-4898.
145. Gepts, W. (1965). "Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus." *Diabetes* 14(10): :619-633.
146. Gerstein, H. C., Miller, M. E., Byington, R. P., Goff, D. C., Jr., Bigger, J. T., Buse, J. B., Cushman, W. C., Genuth, S., Ismail-Beigi, F., Grimm, R. H., Jr., et al. (2008). "Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes." *N Engl J Med* 358(24): 2545-2559.
147. Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S. D. and Richter, C. (1999). "Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation." *J Biol Chem* 274(44): 31185-31188.
148. Ghosh, C. C., Ramaswami, S., Juvekar, A., Vu, H.-Y., Galdieri, L., Davidson, D. and Vancurova, I. (2010). "Gene-Specific Repression of Proinflammatory Cytokines in Stimulated Human Macrophages by Nuclear I κ B α ." *J Immunol* 185(6): 3685-3693.
149. Glaser, C., Demmelmair, H. and Koletzko, B. (2010). "High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification." *PLoS One* 5(8): e12045.
150. Goldstein, L. J., Gallagher, K. A., Bauer, S. M., Bauer, R. J., Baireddy, V., Liu, Z. J., Buerk, D. G., Thom, S. R. and Velazquez, O. C. (2006). "Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide." *Stem Cells* 24(10): 2309-2318.
151. Gordin, D. and Groop, P. H. (2016). "Aspects of Hyperglycemia Contribution to Arterial Stiffness and Cardiovascular Complications in Patients With Type 1 Diabetes." *J Diabetes Sci Technol* 10(5): 1059-1064.

152. Green, C. D., Ozguden-Akkoc, C. G., Wang, Y., Jump, D. B. and Olson, L. K. (2010). "Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species." *J Lipid Res* 51(7): 1871-1877.
153. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids." *Anal Biochem* 126(1): 131-138.
154. Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. and Tanti, J.-F. (2005). "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation." *Biochimie* 87(1): 99-109.
155. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. and Jacobsson, A. (2010). "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice." *Prog Lipid Res* 49(2): 86-99.
156. Guo, X. F., Sinclair, A. J., Kaur, G. and Li, D. (2018). "Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 136: 47-55.
157. Gurdol, F., Cimsit, M., Oner-Iyidogan, Y., Kocak, H., Sengun, S. and Yalcinkaya-Demirsoz, S. (2010). "Collagen synthesis, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in diabetic subjects undergoing hyperbaric oxygen therapy." *Physiol Res* 59(3): 423-429.
158. Guy, J., Ogden, L., Wadwa, R. P., Hamman, R. F., Mayer-Davis, E. J., Liese, A. D., D'Agostino, R., Jr., Marcovina, S. and Dabelea, D. (2009). "Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study." *Diabetes Care* 32(3): 416-420.
159. Gwinn, M. R. and Vallyathan, V. (2006). "Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9(1): 27-39.
160. Haffner, S. M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K. and Laakso, M. (1998). "Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction." *N Engl J Med* 339(4): 229-234.
161. Haffner, S. M., Stern, M. P., Hazuda, H. P., Mitchell, B. D. and Patterson, J. K. (1990). "Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does

- the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?" *Jama* 263(21): 2893-2898.
162. Hallahan, B. and Garland, M. R. (2005). "Essential fatty acids and mental health." *Br J Psychiatry* 186: 275-277.
163. Hamilton, J. S., Powell, L. A., McMaster, C., McMaster, D. and Trimble, E. R. (2003). "Interaction of glucose and long chain fatty acids (C18) on antioxidant defences and free radical damage in porcine vascular smooth muscle cells in vitro." *Diabetologia* 46(1): 106-114.
164. Hannon, T. S., Janosky, J. and Arslanian, S. A. (2006). "Longitudinal study of physiologic insulin resistance and metabolic changes of puberty." *Pediatr Res* 60(6): 759-763.
165. Harding, S. V., Bateman, K. P., Kennedy, B. P., Rideout, T. C. and Jones, P. J. (2015). "Desaturation index versus isotopically measured de novo lipogenesis as an indicator of acute systemic lipogenesis." *BMC Res Notes* 8: 49.
166. Hattori, Y., Hattori, S. and Kasai, K. (2003). "Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation." *Eur J Pharmacol* 481(2-3): 153-158.
167. Heinecke, J. W., Kawamura, M., Suzuki, L. and Chait, A. (1993). "Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms." *J Lipid Res* 34(12): 2051-2061.
168. Hevel, J. M. and Marletta, M. A. (1994). "Nitric-oxide synthase assays." *Methods Enzymol* 233: 250-258.
169. Higashi, Y., Quevedo, H. C., Tiwari, S., Sukhanov, S., Shai, S. Y., Anwar, A. and Delafontaine, P. (2014). "Interaction between insulin-like growth factor-1 and atherosclerosis and vascular aging." *Front Horm Res* 43: 107-124.
170. Hirano, T. (2018). "Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia." *J Atheroscler Thromb* 25(9): 771-782.
171. Hob, M. (1991). "Essential surgery: Problems, diagnoses and treatments." eds. Burkitt, H. G., Quick C. R. G. and Gatt, D. T. Edinburgh: Churchill Livingstone. *BJS* 78(3): p. 800, ISBN: 9780702057090.

172. Hofmann, M. A., Schiekofer, S., Kanitz, M., Klevesath, M. S., Joswig, M., Lee, V., Morcos, M., Tritschler, H., Ziegler, R., Wahl, P., et al. (1998). "Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes." *Diabetes Care* 21(8): 1310-1316.
173. Hohn, D. C., MacKay, R. D., Halliday, B. and Hunt, T. K. (1976). "Effect of O₂ tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro." *Surg Forum* 27(62): 18-20.
174. Hou, C. H., Lin, J., Huang, S. C., Hou, S. M. and Tang, C. H. (2009). "Ultrasound stimulates NF-kappaB activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts." *J Cell Physiol* 220(1): 196-203.
175. House, L. M., 2nd, Morris, R. T., Barnes, T. M., Lantier, L., Cyphert, T. J., McGuinness, O. P. and Otero, Y. F. (2015). "Tissue inflammation and nitric oxide-mediated alterations in cardiovascular function are major determinants of endotoxin-induced insulin resistance." *Cardiovasc Diabetol* 14: 56.
176. Howell, S. L. (1984). "The mechanism of insulin secretion." *Diabetologia* 26(5): 319-327.
177. Huang, B. X., Akbar, M., Kevala, K. and Kim, H. Y. (2011). "Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation." *J Cell Biol* 192(6): 979-992.
178. Hunter, S. J. and Garvey, W. T. (1998). "Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system." *Am J Med* 105(4): 331-345.
179. Ikeda, U., Ikeda, M., Minota, S. and Shimada, K. (1999). "Homocysteine Increases Nitric Oxide Synthesis in Cytokine-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells." *Circulation* 99(9): 1230-1235.
180. Ikeda, U., Maeda, Y., Yamamoto, K. and Shimada, K. (2002). "C-Reactive protein augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes." *Cardiovasc Res* 56(1): 86-92.
181. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" (2010). "Međunarodna statistička klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema." Beograd. p.1123 ISBN 978-86-7358-055-5.

182. Irawan, H., Semadi, I. N. and Widiani, I. G. R. (2018). "A Pilot Study of Short-Duration Hyperbaric Oxygen Therapy to Improve HbA1c, Leukocyte, and Serum Creatinine in Patients with Diabetic Foot Ulcer Wagner 3-4." *Sci World J* 2018: 6425857.
183. Isenovic, E. R., Fretaud, M., Koricanac, G., Sudar, E., Velebit, J., Dobutovic, B. and Marche, P. (2009). "Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117(5): 214-219.
184. Jain, K. K. MA: Hogrefe & Huber Publishers (2009). "Physiological, and Biochemical Aspects of Hyperbaric Oxygenation." In: *Textbook of Hyperbaric Medicine*. Springer, Cham ISBN 978-3-319-47140-2.
185. Jamrozik, K., Broadhurst, R. J., Forbes, S., Hankey, G. J. and Anderson, C. S. (2000). "Predictors of death and vascular events in the elderly : the Perth Community Stroke Study." *Stroke* 31(4): 863-868.
186. Janssen, J. A. and Lamberts, S. W. (2000). "Circulating IGF-I and its protective role in the pathogenesis of diabetic angiopathy." *Clin Endocrinol (Oxf)* 52(1): 1-9.
187. Jiang, B., Xu, S., Hou, X., Pimentel, D. R., Brecher, P. and Cohen, R. A. (2004). "Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression." *J Biol Chem* 279(2): 1323-1329.
188. Jin, R. C. and Loscalzo, J. (2010). "Vascular Nitric Oxide: Formation and Function." *J Blood Med* 2010(1): 147-162.
189. Jones, B. H., Maher, M. A., Banz, W. J., Zemel, M. B., Whelan, J., Smith, P. J. and Moustaid, N. (1996). "Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids." *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): E44-49.
190. Jones, R. J., Jourdeuil, D., Salerno, J. C., Smith, S. M. and Singer, H. A. (2007). "iNOS regulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(6): H2634-42.
191. Kagan, A. (1975). "Radioimmunoassay of insulin." *Semin Nucl Med* 5(2): 183-188.

192. Kalupahana, N. S., Claycombe, K. J. and Moustaid-Moussa, N. (2011). "(n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights." *Adv Nutr* 2(4): 304-316.
193. Kang, E. S., Kim, H. J., Ahn, C. W., Park, C. W., Cha, B. S., Lim, S. K., Kim, K. R. and Lee, H. C. (2005). "Relationship of serum high sensitivity C-reactive protein to metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes." *Diabetes Res Clin Pract* 69(2): 151-159.
194. Kang, M. J., Wu, X., Ly, H., Thai, K. and Scholey, J. W. (1999). "Effect of glucose on stress-activated protein kinase activity in mesangial cells and diabetic glomeruli." *Kidney International* 55(6): 2203-2214.
195. Karadurmus, N., Sahin, M., Tasci, C., Naharci, I., Ozturk, C., Ilbasimis, S., Dulkadir, Z., Sen, A. and Saglam, K. (2010). "Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot." *Endokrynol Pol* 61(3): 275-279.
196. Kato, Y., Miura, Y., Yamamoto, N., Ozaki, N. and Oiso, Y. (2003). "Suppressive effects of a selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor on pancreatic beta-cell dysfunction." *Diabetologia* 46(9): 1228-1233.
197. Kawazoe, Y., Naka, T., Fujimoto, M., Kohzaki, H., Morita, Y., Narazaki, M., Okumura, K., Saitoh, H., Nakagawa, R., Uchiyama, Y., et al. (2001). "Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation." *J Exp Med* 193(2): 263-269.
198. Kehat, I. and Molkentin, J. D. (2010). "Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy." *Ann N Y Acad Sci* 1188: 96-102.
199. Kei-ichi, O., Midori, A., Mayuko, T., Yuka, I., Aya, H., Satomi, K., Susumu, T. and Michiaki, K. (2016). "Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310(8): E643-E651.
200. Kelley, K. M., Oh, Y. M., Gargosky, S. E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D. M. and Rosenfeld, R. G. (1996). "Insulin-like growth factor-

- binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics." *Int J Biochem Cell Biol* 28(6): 619-637.
201. Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K. and McIntosh, M. (2009). "Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications." *J Nutr* 139(1): 1-4.
202. Kielar, M. L., Jeyarajah, D. R., Penfield, J. G. and Lu, C. Y. (2000). "Docosahexaenoic acid decreases IRF-1 mRNA and thus inhibits activation of both the IRF-E and NFkappa d response elements of the iNOS promoter." *Transplantation* 69(10): 2131-2137.
203. Kielar, M. L., Jeyarajah, D. R., Zhou, X. J. and Lu, C. Y. (2003). "Docosahexaenoic Acid Ameliorates Murine Ischemic Acute Renal Failure and Prevents Increases in mRNA Abundance for both TNF- α and Inducible Nitric Oxide Synthase." *J Am Soc Nephrol* 14(2): 389-396.
204. Kim, F., Gallis, B. and Corson, M. A. (2001). "TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(5): C1057-1065.
205. Kim, F., Tysseling, K. A., Rice, J., Pham, M., Haji, L., Gallis, B. M., Baas, A. S., Paramsothy, P., Giachelli, C. M., Corson, M. A., et al. (2005). "Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5): 989-994.
206. Kim, J. W. and Kim, C. (2005). "Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB." *Biochem Pharmacol* 70(9): 1352-1360.
207. Kim, N., Lee, J. O., Lee, H. J., Kim, H. I., Kim, J. K., Lee, Y. W., Lee, S. K., Kim, S. J., Park, S. H. and Kim, H. S. (2015). "Endogenous Ligand for GPR120, Docosahexaenoic Acid, Exerts Benign Metabolic Effects on the Skeletal Muscles via AMP-activated Protein Kinase Pathway." *J Biol Chem* 290(33): 20438-20447.
208. Kim, Y. M., Bombeck, C. A. and Billiar, T. R. (1999). "Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis." *Circ Res* 84(3): 253-256.

209. King, D. E., Mainous, A. G., Buchanan, T. A. and Pearson, W. S. (2003). "C-Reactive Protein and Glycemic Control in Adults With Diabetes." *Diabetes Care* 26(5): 1535-1539.
210. Kinsella, J. E., Lokesh, B. and Stone, R. A. (1990). "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms." *Am J Clin Nutr* 52(1): 1-28.
211. Kitada, M., Zhang, Z., Mima, A. and King, G. L. (2010). "Molecular mechanisms of diabetic vascular complications." *J Diabetes Investig* 1(3): 77-89.
212. Kitayama, J., Faraci, F. M., Gunnnett, C. A. and Heistad, D. D. (2006). "Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: role of inducible NO synthase." *Stroke* 37(8): 2129-2133.
213. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Jax, T., Kerber, S., Gharini, P., Balzer, J., Zotz, R. B., Scharf, R. E., Willers, R., et al. (2006). "Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans." *Free Radic Biol Med* 40(2): 295-302.
214. Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochem J* 298(Pt 2): 249-258.
215. Koong, A. C., Chen, E. Y. and Giaccia, A. J. (1994). "Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues." *Cancer Res* 54(6): 1425-1430.
216. Korkmaz-Icöz, S., Li, S., Loganathan, S., Radovits, T., Ruppert, M., Brlecic, P., Fleming, T., Brune, M., Most, P., Karck, M., et al. (2017). "Impairment of the Protective PI3K/Akt Signaling Pathway in Transplanted Type-1 Diabetic Hearts Increases Post-Transplant Myocardial Injury." *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 36(4): 884-894.
217. Koska, J., Ozias, M. K., Deer, J., Kurtz, J., Salbe, A. D., Harman, S. M. and Reaven, P. D. (2016). "A human model of dietary saturated fatty acid induced insulin resistance." *Metabolism* 65(11): 1621-1628.
218. Kotamraju, S., Tampo, Y., Keszler, A., Chitambar, C. R., Joseph, J., Haas, A. L. and Kalyanaraman, B. (2003). "Nitric oxide inhibits H₂O₂-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10653-10658.

219. Koyasu, S. and Moro, K. (2012). "Role of innate lymphocytes in infection and inflammation." *Front Immunol* 3: 101.
220. Kranke, P., Bennett, M., Roeckl-Wiedmann, I. and Debus, S. (2004). "Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds." *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD004123.
221. Krishna Mohan, I. and Das, U. N. (2001). "Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids." *Nutrition* 17(2): 126-151.
222. Kroll, J. and Waltenberger, J. (1998). "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)." *Biochem Biophys Res Commun* 252(3): 743-746.
223. Kroncke, K. D., Kolb-Bachofen, V., Berschick, B., Burkart, V. and Kolb, H. (1991). "Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation." *Biochem Biophys Res Commun* 175(3): 752-758.
224. Kudchodkar, B. J., Pierce, A. and Dory, L. (2007). "Chronic hyperbaric oxygen treatment elicits an anti-oxidant response and attenuates atherosclerosis in apoE knockout mice." *Atherosclerosis* 193(1): 28-35.
225. Kudchodkar, B. J., Wilson, J., Lacko, A. and Dory, L. (2000). "Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1637-1643.
226. Kuhlencordt Peter, J., Chen, J., Han, F., Astern, J. and Huang Paul, L. (2001). "Genetic Deficiency of Inducible Nitric Oxide Synthase Reduces Atherosclerosis and Lowers Plasma Lipid Peroxides in Apolipoprotein E-Knockout Mice." *Circulation* 103(25): 3099-3104.
227. Kuo, P. C., Abe, K. Y. and Schroeder, R. A. (1997). "Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promoter activity." *Biochem Biophys Res Commun* 234(2): 289-292.
228. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. and Avruch, J. (1992). "Raf-1 activates MAP kinase-kinase." *Nature* 358(6385).

229. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
230. Lang, C. H., Nystrom, G. J. and Frost, R. A. (1999). "Regulation of IGF binding protein-1 in hep G2 cells by cytokines and reactive oxygen species." *Am J Physiol* 276(3): G719-727.
231. Langlais, P., Yi, Z., Finlayson, J., Luo, M., Mapes, R., De Filippis, E., Meyer, C., Plummer, E., Tongchinsub, P., Mattern, M., et al. (2011). "Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance." *Diabetologia* 54(11): 2878-2889.
232. Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehses, J. A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T. and Donath, M. Y. (2007). "Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus." *N Engl J Med* 356(15): 1517-1526.
233. Larsen, C. M., Wadt, K. A., Juhl, L. F., Andersen, H. U., Karlsen, A. E., Su, M. S., Seedorf, K., Shapiro, L., Dinarello, C. A. and Mandrup-Poulsen, T. (1998). "Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* 273(24): 15294-15300.
234. Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2903-2910.
235. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V. and Karin, M. (2005). "IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation." *Nature* 434(7037): 1138-1143.
236. Lee, J. H., Kim, S.-H., Kang, S.-H., Cho, J. H., Cho, Y., Oh, I.-Y., Yoon, C.-H., Lee, H.-Y., Youn, T.-J., Chae, I.-H., et al. (2018). "Blood Pressure Control and Cardiovascular Outcomes: Real-world Implications of the 2017 ACC/AHA Hypertension Guideline." *Sci Rep* 8(1): 13155.
237. Lee, R. M., Cobb, M. H. and Blackshear, P. J. (1992). "Evidence that extracellular signal-regulated kinases are the insulin-activated Raf-1 kinase kinases." *J Biol Chem* 267(2): 1088-1092.
238. Lee, S. J. and Stull, J. T. (1998). "Calmodulin-dependent regulation of inducible and neuronal nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* 273(42): 27430-27437.
239. Lefkowitz, J., Schreiner, G., Cormier, J., Handler, E. S., Driscoll, H. K., Greiner, D., Mordes, J. P. and Rossini, A. A. (1990). "Prevention of diabetes in the BB rat

- by essential fatty acid deficiency. Relationship between physiological and biochemical changes." *J Exp Med* 171(3): 729-743.
240. Leibach, A., Scharf, J. G. and Ramadori, G. (2001). "Regulation of insulin-like growth factor-I and of insulin-like growth factor binding protein-1, -3 and -4 in cocultures of rat hepatocytes and Kupffer cells by interleukin-6." *J Hepatol* 35(5): 558-567.
241. Leon, B. M. and Maddox, T. M. (2015). "Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research." *World J Diabetes* 6(13): 1246-1258.
242. Levy-Marchal, C., Arslanian, S., Cutfield, W., Sinaiko, A., Druet, C., Marcovecchio, M. L. and Chiarelli, F. (2010). "Insulin resistance in children: consensus, perspective, and future directions." *J Clin Endocrinol Metab* 95(12): 5189-5198.
243. Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." *Adv Cancer Res* 74: 49-139.
244. Li, P., Zhang, L., Tian, X. and Xing, J. (2014). "Docosahexaenoic acid has an anti-diabetic effect in streptozotocin-induced diabetic mice." *Int J Clin Exp Med* 7(9): 3021-3029.
245. Li, T., Chen, Y., Li, J., Yang, X., Zhang, H., Qin, X., Hu, Y. and Mo, Z. (2015). "Serum Homocysteine Concentration Is Significantly Associated with Inflammatory/Immune Factors." *PLoS One* 10(9): 0138099.
246. Liang, L., Gao, G. and Wu, J. (2018). "Effects of hyperbaric oxygen on adiponectin and glucose transporter 4 expression in type 2 diabetic rats." *Chronic Diseases Prevention Review* 6: 1-5.
247. Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Markham, B. E. and Molkentin, J. D. (2001). "The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes." *Mol Cell Biol* 21(21): 7460-7469.
248. Liu, A., Yu, Z., Wang, N. and Wang, W. (2015). "Carotid atherosclerosis is associated with hypertension in a hospital-based retrospective cohort." *Int J Clin Exp Med* 8(11): 21932-21938.

249. Liu, L. L., Lawrence, J. M., Davis, C., Liese, A. D., Pettitt, D. J., Pihoker, C., Dabelea, D., Hamman, R., Waitzfelder, B. and Kahn, H. S. (2010). "Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study." *Pediatr Diabetes* 11(1): 4-11.
250. Liu, Y.-D., Wang, Z.-B., Han, G., Jin, L. and Zhao, P. (2019). "Hyperbaric oxygen relieves neuropathic pain through AKT/TSC2/mTOR pathway activity to induce autophagy." *J Pain Res* 12: 443-451.
251. Liu, Y.-D., Wang, Z.-B., Han, G. and Zhao, P. (2017). "Hyperbaric oxygen treatment attenuates neuropathic pain by elevating autophagy flux via inhibiting mTOR pathway." *Am J Transl Res* 9(5): 2629-2638.
252. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
253. Luo, P. and Wang, M.-H. (2011). "Eicosanoids, β -cell function, and diabetes." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 95(1): 1-10.
254. Lyons, C. R., Orloff, G. J. and Cunningham, J. M. (1992). "Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line." *J Biol Chem* 267(9): 6370-6374.
255. Lyons, T. J. and Basu, A. (2012). "Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers." *Transl Res* 159(4): 303-312.
256. MacDonald, M. L., Singaraja, R. R., Bissada, N., Ruddle, P., Watts, R., Karasinska, J. M., Gibson, W. T., Fievet, C., Vance, J. E., Staels, B., et al. (2008). "Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice." *J Lipid Res* 49(1): 217-229.
257. Maechler, P., Jornot, L. and Wollheim, C. B. (1999). "Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells." *J Biol Chem* 274(39): 27905-27913.
258. Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P. A. and Donath, M. Y. (2002). "Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets." *J Clin Invest* 110(6): 1589.
259. Maeno, Y., Li, Q., Park, K., Rask-Madsen, C., Gao, B., Matsumoto, M., Liu, Y., Wu, I. H., White, M. F., Feener, E. P., et al. (2012). "Inhibition of insulin

- signaling in endothelial cells by protein kinase C-induced phosphorylation of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)." *J Biol Chem* 287(7): 4518-4530.
260. Mandrup-Poulsen, T. (1996). "The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM." *Diabetologia* 39(9): 1005-1029.
261. Manna, P. and Jain, S. K. (2012). "Decreased hepatic phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) levels and impaired glucose homeostasis in type 1 and type 2 diabetic rats." *Cell Physiol Biochem* 30(6): 1363-1370.
262. Manninen, V., Elo, M. O., Frick, M. H., Haapa, K., Heinonen, O. P., Heinsalmi, P., Helo, P., Huttunen, J. K., Kaitaniemi, P., Koskinen, P., et al. (1988). "Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study." *Jama* 260(5): 641-651.
263. Manrique, C., Lastra, G. and Sowers, J. R. (2014). "New insights into insulin action and resistance in the vasculature." *Ann N Y Acad Sci* 1311: 138-150.
264. Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E. and Arrigo, T. (2015). "Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases." *Int J Mol Sci* 16(1): 378-400.
265. Martinelli, N., Girelli, D., Malerba, G., Guarini, P., Illig, T., Trabetti, E., Sandri, M., Friso, S., Pizzolo, F., Schaeffer, L., et al. (2008). "FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease." *Am J Clin Nutr* 88(4): 941-949.
266. Marx, R. E., Ehler, W. J., Tayapongsak, P. and Pierce, L. W. (1990). "Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue." *Am J Surg* 160(5): 519-524.
267. Mathieu, D., Favory, R., Collet, F., Linke, J.-C. and Wattel, F. (2006). "Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygen on Hemodynamics and Microcirculation." *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Mathieu. Springer Netherlands, Dordrecht. p. 75-101.
268. Mattioli, I., Sebald, A., Bucher, C., Charles, R. P., Nakano, H., Doi, T., Kracht, M. and Schmitz, M. L. (2004). "Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B

- kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import." *J Immunol* 172(10): 6336-6344.
269. Meade, C. J. and Mertin, J. (1978). "Fatty Acids and Immunity." *Advances in Lipid Research*. eds. Paoletti and Kritchevsky. Elsevier, 16: 127-165.
270. Meier, D. T., Ehses, J. A., Donath, M. Y., Prazak, R., Boller, S., Böni-Schnetzler, M., Schuit, F. C., Debray, S., Bouzakri, K., Pattou, F., et al. (2009). "Free Fatty Acids Induce a Proinflammatory Response in Islets via the Abundantly Expressed Interleukin-1 Receptor." *Endocrinology* 150(12): 5218-5229.
271. Meikle, P. J., Barlow, C. K., Mellett, N. A., Mundra, P. A., Bonham, M. P., Larsen, A., Cameron-Smith, D., Sinclair, A. J., Nestel, P. and Wong, G. (2015). "Postprandial Plasma Phospholipids in Men Are Influenced by the Source of Dietary Fat." *J Nutr* 145(9): 2012-2018.
272. Meng, X.-E., Zhang, Y., Li, N., Fan, D.-F., Yang, C. Y., Li, H., Guo, D.-Z. and Pan, S.-Y. (2016). "Hyperbaric Oxygen Alleviates Secondary Brain Injury After Trauma Through Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway." *Med Sci Monit* 22: 284-288.
273. Merger, S. R., Kerner, W., Stadler, M., Zeyfang, A., Jehle, P., Muller-Korbsch, M. and Holl, R. W. (2016). "Prevalence and comorbidities of double diabetes." *Diabetes Res Clin Pract* 119: 48-56.
274. Mikkelsen, R. B. and Wardman, P. (2003). "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms." *Oncogene* 22(37): 5734-5754.
275. Milačić, M. D., Matković, T., Lalić, A., Stanimirović, J., Gluvić, G. and Isenović, R. E. (2015). "Lečenje sindroma plavih prstiju hiperbaričnom oksigenoterapijom- prikaz slučaja." *Medicinska istraživanja* 49(2): 46-50.
276. Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G. and Eichmann, K. (1995). "Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines." *Eur J Immunol* 25(4): 1101-1104.
277. Mohammad, G., Mairaj Siddiquei, M., Imtiaz Nawaz, M. and Abu El-Asrar, A. M. (2013). "The ERK1/2 Inhibitor U0126 Attenuates Diabetes-Induced

- Upregulation of MMP-9 and Biomarkers of Inflammation in the Retina." *J Diabetes Res* 2013: 658548.
278. Moller, D. E. (2000). "Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." *Trends Endocrinol Metab* 11(6): 212-217.
279. Moran, A., Steffen, L. M., Jacobs, D. R., Steinberger, J., Pankow, J. S., Hong, C.-P., Tracy, R. P. and Sinaiko, A. R. (2005). "Relation of C-Reactive Protein to Insulin Resistance and Cardiovascular Risk Factors in Youth." *Diabetes Care* 28(7): 1763-1768.
280. Morgan, N. G. and Dhayal, S. (2009). "G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell." *Biochem Pharmacol* 78(12): 1419-1427.
281. Mori, M. and Gotoh, T. (2000). "Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes." *Biochem Biophys Res Commun* 275(3): 715-719.
282. Morris, C. R., Poljakovic, M., Lavrisha, L., Machado, L., Kuypers, F. A. and Morris, S. M., Jr. (2004). "Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 170(2): 148-153.
283. Muhammed, S. J., Lundquist, I. and Salehi, A. (2012). "Pancreatic beta-cell dysfunction, expression of iNOS and the effect of phosphodiesterase inhibitors in human pancreatic islets of type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 14(11): 1010-1019.
284. Muller-Wieland, D., Behnke, B., Diederichsen, D. and Krone, W. (1994). "Inhibition of fatty acid synthesis by stimulation of alpha- and beta-adrenergic receptors in human mononuclear leukocytes." *Horm Metab Res* 26(4): 169-172.
285. Murdolo, G. and Smith, U. (2006). "The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1: S35-38.
286. Musunuru, K. (2010). "Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention." *Lipids* 45(10): 907-914.
287. Myers, M. G., Jr. (2004). "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." *Recent Prog Horm Res* 59: 287-304.
288. Nagareddy, P. R., Soliman, H., Lin, G., Rajput, P. S., Kumar, U., McNeill, J. H. and MacLeod, K. M. (2009). "Selective Inhibition of Protein Kinase C β (2)

- Attenuates Inducible Nitric Oxide Synthase–Mediated Cardiovascular Abnormalities in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Diabetes* 58(10): 2355-2364.
289. Naidina, V. P., Pepeliaev Iu, V. and Buravkova, L. B. (2009). "[Changes of higher fatty acid composition in blood plasma and erythrocyte membranes during long exposure of a human to hyperbaric gas medium]." *Fiziol Cheloveka* 35(4): 57-63.
290. Nakamura, M. T. and Nara, T. Y. (2003). "Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68(2): 145-50.
291. Napoli, C. and Ignarro, L. J. (2009). "Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases." *Arch Pharm Res* 32(8): 1103-1108.
292. Natarajan, S., Liao, Y., Sinha, D., Cao, G., McGee, D. L. and Lipsitz, S. R. (2005). "Sex differences in the effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality." *Arch Intern Med* 165(4): 430-435.
293. Nathan, C. F. and Hibbs, J. B., Jr. (1991). "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity." *Curr Opin Immunol* 3(1): 65-70.
294. Nathan, D. M., Genuth, S., Lachin, J., Cleary, P., Crofford, O., Davis, M., Rand, L. and Siebert, C. (1993). "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus." *N Engl J Med* 329(14): 977-86.
295. National Diabetes Data Group (1979). "Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance." *Diabetes Care* 28(12): 1039-1057.
296. National Institutes of Health (1998). "Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults-The Evidence Report." *Obes Res* 6(Suppl 2): 51S-209S.
297. NCD Risk Factor Collaboration (2017). "Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults." *Lancet* 390(10113): 2627-2642.

298. Negi, G., Kumar, A. and Sharma, S. S. (2011). "Nrf2 and NF-kappaB modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes." *Curr Neurovasc Res* 8(4): 294-304.
299. Nematollahi, S., Nematbakhsh, M., Haghjooyjavanmard, S., Khazaei, M. and Salehi, M. (2009). "Inducible nitric oxide synthase modulates angiogenesis in ischemic hindlimb of rat." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153(2): 125-129.
300. Nesto, R. (2004). "C-reactive protein, its role in inflammation, Type 2 diabetes and cardiovascular disease, and the effects of insulin-sensitizing treatment with thiazolidinediones." *Diabet Med* 21(8): 810-817.
301. Ng, Y., Ramm, G., Lopez, J. A. and James, D. E. (2008). "Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes." *Cell Metab* 7(4): 348-356.
302. Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B. and Dumon, H. (2008). "Liver lipid metabolism." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92(3): 272-283.
303. Nikolic Turnic, T., Arsic, A., Vucic, V., Petrovic, S., Ristic-Medic, D., Zivkovic, V., Srejovic, I., Jeremic, J., Radonjic, T., Milosavljevic, I., et al. (2019). "Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors Differentially Modulate Plasma Fatty Acids in Rats With Diet-Induced-Hyperhomocysteinemia: Is ω -3 Fatty Acids Supplementation Necessary?" *Front Physiol* 10: 892.
304. Niroumand, S., Khajedaluae, M., Khadem-Rezaiyan, M., Abrishami, M., Juya, M., Khodae, G. and Dadgarmoghaddam, M. (2015). "Atherogenic Index of Plasma (AIP): A marker of cardiovascular disease." *Med J Islam Repub Iran* 29: 240.
305. Niu, C.-C., Lin, S.-S., Yuan, L.-J., Lu, M.-L., Ueng, S. W. N., Yang, C.-Y., Tsai, T.-T. and Lai, P.-L. (2019). "Upregulation of miR-107 expression following hyperbaric oxygen treatment suppresses HMGB1/RAGE signaling in degenerated human nucleus pulposus cells." *Arthritis Res Ther* 21(1): 42.
306. Niu, C. C., Lin, S. S., Yuan, L. J., Chen, L. H., Wang, I. C., Tsai, T. T., Lai, P. L. and Chen, W. J. (2013). "Hyperbaric oxygen treatment suppresses MAPK

- signaling and mitochondrial apoptotic pathway in degenerated human intervertebral disc cells." *J Orthop Res* 31(2): 204-209.
307. Norris, J. M., Yin, X., Lamb, M. M., Barriga, K., Seifert, J., Hoffman, M., Orton, H. D., Baron, A. E., Clare-Salzler, M., Chase, H. P., et al. (2007). "Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes." *JAMA* 298(12): 1420-1428.
308. Nwafor, T. S. and Collins, N. (2014). "Managing low blood glucose levels in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy." *Ostomy Wound Manage* 60(4): 12-5.
309. Obradovic, M., Zaric, B. L., Haidara, M. A. and Isenovic, E. R. (2018). "Link between Homocysteine and Cardiovascular Diseases." *Cur Pharm Rep* 4(1): 1-9.
310. Oh, Y. T., Liu, X., Yue, P., Kang, S., Chen, J., Taunton, J., Khuri, F. R. and Sun, S. Y. (2010). "ERK/ribosomal S6 kinase (RSK) signaling positively regulates death receptor 5 expression through co-activation of CHOP and Elk1." *J Biol Chem* 285(53).
311. Okatani, Y., Watanabe, K., Wakatsuki, A., Tamura, S. and Sagara, Y. (1998). "Effects of superoxide and peroxynitrite on vascular tension in the human umbilical artery." *Acta Obstet Gynecol Scand* 77(9): 41310-41319.
312. Orasanu, G. and Plutzky, J. (2009). "The pathologic continuum of diabetic vascular disease." *J Am Coll Cardiol* 53(5 Suppl): S35-42.
313. Orchard, T. J., Chang, Y. F., Ferrell, R. E., Petro, N. and Ellis, D. E. (2002). "Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study." *Kidney Int* 62(3): 963-970.
314. Orchard, T. J., Olson, J. C., Erbey, J. R., Williams, K., Forrest, K. Y., Smithline Kinder, L., Ellis, D. and Becker, D. J. (2003). "Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study." *Diabetes Care* 26(5): 1374-1379.
315. Orlowski, C. C., Ooi, G. T., Brown, D. R., Yang, Y. W., Tseng, L. Y. and Rechler, M. M. (1991). "Insulin rapidly inhibits insulin-like growth factor-

- binding protein-1 gene expression in H4-II-E rat hepatoma cells." *Mol Endocrinol* 5(8): :1180-1187.
316. Ostendorf, T., van Roeyen, C., Westenfeld, R., Gawlik, A., Kitahara, M., de Heer, E., Kerjaschki, D., Floege, J. and Ketteler, M. (2004). "Inducible Nitric Oxide Synthase–Derived Nitric Oxide Promotes Glomerular Angiogenesis via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors." *J Am Soc Nephrol* 15(9): 2307-2319.
317. Otton, R., Mendonca, J. R. and Curi, R. (2002). "Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism." *J Endocrinol* 174(1): :55-61.
318. Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* 18(49): 6853-6866.
319. Pallares, V., Calay, D., Cedo, L., Castell-Auvi, A., Raes, M., Pinent, M., Ardevol, A., Arola, L. and Blay, M. (2012). "Enhanced anti-inflammatory effect of resveratrol and EPA in treated endotoxin-activated RAW 264.7 macrophages." *Br J Nutr* 108(9): 1562-1573.
320. Panic, A. and Stanimirovic, J. (2018). "Estradiol-mediated regulation of hepatic iNOS in obese rats: Impact of Src, ERK1/2, AMPKalpha, and miR-221." *Biotechnol Appl Biochem* 65(6): 797-806.
321. Pantović, R., Draganić, P., Eraković, V., Blagović, B., Milin, M. and Simonić, A. (2005). "Effect of Hyperbaric Oxygenation on the Level of Free Fatty Acids in Experimental Spinal Cord Injury in Rabbits." *Cro Chem Acta* 78(3): 455-462.
322. Papapetropoulos, A., Rudic, R. D. and Sessa, W. C. (1999). "Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system." *Cardiovasc Res* 43(3): 509-520.
323. Parola, M. and Robino, G. (2001). "Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis." *J Hepatol* 35(2): 297-306.
324. Paton, C. M. and Ntambi, J. M. (2009). "Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(1): E28-37.
325. Pavlovic, D., Andersen, N. A., Mandrup-Poulsen, T. and Eizirik, D. L. (2000). "Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells." *Eur Cytokine Netw* 11(2): 267-274.

326. Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H. and Zick, Y. (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 272(47): 29911-29918.
327. Pedoto, A., Nandi, J., Yang, Z. J., Wang, J., Bosco, G., Oler, A., Hakim, T. S. and Camporesi, E. M. (2003). "Beneficial effect of hyperbaric oxygen pretreatment on lipopolysaccharide-induced shock in rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(7): :482-488.
328. Peytremann-Bridevaux, I. and Santos-Eggimann, B. (2008). "Health correlates of overweight and obesity in adults aged 50 years and over: results from the Survey of Health, Ageing and Retirement in Europe (SHARE). Obesity and health in Europeans aged > or = 50 years." *Swiss Med Wkly* 138(17-18): 261-266.
329. Pierre, S., Bats, A. S. and Coumoul, X. (2011). "Understanding SOS (Son of Sevenless)." *Biochem Pharmacol* 82(9): 1049-1056.
330. Pietri, A. O., Dunn, F. L., Grundy, S. M. and Raskin, P. (1983). "The effect of continuous subcutaneous insulin infusion on very-low-density lipoprotein triglyceride metabolism in type I diabetes mellitus." *Diabetes* 32(1): 75-81.
331. Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe, C. S. and Lernmark, Å. (2005). "Autoantibodies in Diabetes." *Diabetes* 54(suppl 2).
332. Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. and Seger, R. (2011). "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation." *Biochim Biophys Acta* 1813(9): 1619-1633.
333. Pociot, F. (2017). "Type 1 diabetes genome-wide association studies: not to be lost in translation." *Clinical & translational immunology* 6(12) :e162.
334. Steck, A. K. and Rewers, M. J. (2016). " Genetics of Type 1 Diabetes." *Clin Chem* 57(2): 176–185.
335. Poderoso, J. J., Carreras, M. C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F. and Boveris, A. (1996). "Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles." *Arch Biochem Biophys* 328(1): 85-92.

336. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E. and Ridker, P. M. (2001). "C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus." *JAMA* 286(3): :327-334.
337. Punthakee, Z., Goldenberg, R. and Katz, P. (2018). "Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome." *Can J Diabetes* 42 Suppl 1: S10-S15.
338. Puthanveetil, P., Wang, Y., Zhang, D., Wang, F., Kim, M. S., Innis, S., Pulinilkunnil, T., Abrahani, A. and Rodrigues, B. (2011). "Cardiac triglyceride accumulation following acute lipid excess occurs through activation of a FoxO1–iNOS–CD36 pathway." *Free Radic Biol Med* 51(2): 352-363.
339. Puthuchery, Z. A., Liu, J., Bennett, M., Trytko, B., Chow, S. and Thomas, P. S. (2006). "Exhaled Nitric Oxide is Decreased by Exposure to the Hyperbaric Oxygen Therapy Environment." *Mediators Inflamm* 2006(5): 72620.
340. Puttemans, T. and Nemery, C. (1998). "Diabetes: the use of color Doppler sonography for the assessment of vascular complications." *Eur J Ultrasound* 7(1): 15-22.
341. Quintero, P., Gonzalez-Muniesa, P., Garcia-Diaz, D. F. and Martinez, J. A. (2012). "Effects of hyperoxia exposure on metabolic markers and gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *J Physiol Biochem* 68(4): 663-669.
342. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L., Sorensen, O. and Bleackley, R. C. (1996). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS- expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets." *Endocrinology* 137(5): 2093-2099.
343. Rahman, S., Rahman, T., Ismail, A. A. and Rashid, A. R. (2007). "Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis." *Diabetes Obes Metab* 9(6): 767-780.
344. Rains, J. L. and Jain, S. K. (2011). "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes." *Free Radic Biol Med* 50(5): 567-575.
345. Rajwani, A., Ezzat, V., Smith, J., Yuldasheva, N. Y., Duncan, E. R., Gage, M., Cubbon, R. M., Kahn, M. B., Imrie, H., Abbas, A., et al. (2012). "Increasing Circulating IGFBP1 Levels Improves Insulin Sensitivity, Promotes Nitric Oxide

- Production, Lowers Blood Pressure, and Protects Against Atherosclerosis." *Diabetes* 61(4): 915-924.
346. Ray, K. K., Seshasai, S. R., Wijesuriya, S., Sivakumaran, R., Nethcott, S., Preiss, D., Erqou, S. and Sattar, N. (2009). "Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials." *Lancet* 373(9677): 1765-1772.
347. Redondo, M. J., Rodriguez, L. M., Haymond, M. W., Hampe, C. S., Smith, E. O., Balasubramanyam, A. and Devaraj, S. (2014). "Serum adiposity-induced biomarkers in obese and lean children with recently diagnosed autoimmune type 1 diabetes." *Pediatr Diabetes* 15(8): 543-549.
348. Registar za dijabetes u Srbiji (2016). "Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji." Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, Beograd. p. 81, ISSN 2560-466X
349. Rehman, K. and Akash, M. S. (2016). "Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked?" *J Biomed Sci* 23(1): 87.
350. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse (2012). "Nacionalni vodič dobre kliničke prakse *Diabetes Mellitus*." Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije, Beograd. p. 66.
351. Ristic-Medic, D., Suzic, S., Vucic, V., Takic, M., Tepsic, J. and Glibetic, M. (2009). "Serum and erythrocyte membrane phospholipids fatty acid composition in hyperlipidemia: effects of dietary intervention and combined diet and fibrate therapy." *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No: 190-199.
352. Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G. and Karin, M. (2008). "NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha." *Nature* 453(7196): 807-811.
353. Rizza, S., Tesauro, M., Cardillo, C., Galli, A., Iantorno, M., Gigli, F., Sbraccia, P., Federici, M., Quon, M. J. and Lauro, D. (2009). "Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes." *Atherosclerosis* 206(2): 569-574.

-
354. Rodriguez-Manas, L., Lopez-Doriga, P., Petidier, R., Neira, M., Solis, J., Pavon, I., Peiro, C. and Sanchez-Ferrer, C. F. (2003). "Effect of glycaemic control on the vascular nitric oxide system in patients with type 1 diabetes." *J Hypertens* 21(6): 1137-1143.
355. Rojas, J. M., Oliva, J. L. and Santos, E. (2011). "Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives." *Genes Cancer* 2(3): 298-305.
356. Rossignol, D. A., Rossignol, L. W., James, S. J., Melnyk, S. and Mumper, E. (2007). "The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation, and symptoms in children with autism: an open-label pilot study." *BMC Pediatr* 7: 36.
357. Rowley, W. R., Bezold, C., Arikan, Y., Byrne, E. and Krohe, S. (2017). "Diabetes 2030: Insights from Yesterday, Today, and Future Trends." *Population health management. Popul Health Manag* 20(1): 6-12.
358. Ruiz-Gutierrez, V., Stiefel, P., Villar, J., García-Donas, M. A., Acosta, D. and Carneado, J. (1993). "Cell membrane fatty acid composition in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: relationship with sodium transport abnormalities and metabolic control." *Diabetologia* 36(9): 850-856.
359. Silver, J. H. (2011). "Nitrite and Nitric Oxide as Potential Diagnostic Markers in Acute Vascular Diseases." *J Neur Neurophys* S1-005.
360. Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A. A. and Natoli, G. (2004). "Degradation of Promoter-bound p65/RelA Is Essential for the Prompt Termination of the Nuclear Factor κ B Response." *J Exp Med* 200(1): 107–113.
361. Sakai, K., Suzuki, H., Oda, H., Akaike, T., Azuma, Y., Murakami, T., Sugi, K., Ito, T., Ichinose, H., Koyasu, S., et al. (2006). "Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxide synthesis in macrophage: critical dimerization of inducible nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* 281(26): 17736-17742.
362. Sale, E. M. and Sale, G. J. (2008). "Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting." *Cell Mol Life Sci* 65(1): 113-127.
363. Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* 414(6865): 799-806.

-
364. Saltzman, H. A. (1965). "Hyperbaric oxygen in cardiovascular disease. Potential usages and hazards." *Circulation* 31: 454-462.
365. Saluja, R., Jyoti, A., Chatterjee, M., Habib, S., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M. K., Bajpai, V. K. and Dikshit, M. (2011). "Molecular and biochemical characterization of nitric oxide synthase isoforms and their intracellular distribution in human peripheral blood mononuclear cells." *Biochim Biophys Acta* 1813(10): 1700-1707.
366. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* 307(5712): 1098-10101.
367. Sass, G., Koerber, K., Bang, R., Guehring, H. and Tiegs, G. (2001). "Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice." *J Clin Invest* 107(4): 439-447.
368. Scheid, M. P., Marignani, P. A. and Woodgett, J. R. (2002). "Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B." *Mol Cell Biol* 22(17): 6247-6260.
369. Schwingshackl, L. and Hoffmann, G. (2012). "Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses." *Nutrients* 4(12): 1989-2007.
370. Shah, A. M. (2000). "Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease." *Cardiovasc Res* 45(1): 148-155.
371. Shah, J. (2010). "Hyperbaric oxygen therapy." *J Am Col Certif Wound Spec* 2(1).
372. Shantakumari, N., Eldeeb, R. A., Ibrahim, S. A. M., Sreedharan, J. and Otoum, S. (2014). "Effect of PUFA on patients with hypertension: a hospital based study." *Indian Heart J* 66(4): 408-414.
373. Sharer, N. M., Monk, S. J. and Nunn, J. F. (1983). "No effect of hyperbaric oxygen on methionine synthetase activity in rats." *Anesthesiology* 59(5): 440-441.
374. Sharma, A., Purohit, S., Sharma, S., Bai, S., Zhi, W., Ponny, S. R., Hopkins, D., Steed, L., Bode, B., Anderson, S. W., et al. (2016). "IGF-Binding Proteins in Type-1 Diabetes Are More Severely Altered in the Presence of Complications." *Front Endocrinol (Lausanne)* 7: 2.

-
375. Sheldon, J., Riches, P., Gooding, R., Soni, N. and Hobbs, J. R. (1993). "C-reactive protein and its cytokine mediators in intensive-care patients." *Clin Chem* 39(1): 147-150.
376. Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A. and Sakharkar, M. K. (2016). "Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients." *Biomark Insights* 11: 95-104.
377. Shi, C. and Pamer, E. G. (2011). "Monocyte recruitment during infection and inflammation." *Nat Rev Immunol* 11(11): 762-774.
378. Shimabukuro, M., Ohneda, M., Lee, Y. and Unger, R. H. (1997). "Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease." *J Clin Invest* 100(2): 290-295.
379. Shindou, H., Koso, H., Sasaki, J., Nakanishi, H., Sagara, H., Nakagawa, K. M., Takahashi, Y., Hishikawa, D., Iizuka-Hishikawa, Y., Tokumasu, F., et al. (2017). "Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells." *J Biol Chem* 292(29): 12054-12064.
380. Shinozaki, S., Choi, C. S., Shimizu, N., Yamada, M., Kim, M., Zhang, T., Shiota, G., Dong, H. H., Kim, Y. B. and Kaneki, M. (2011). "Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice." *J Biol Chem* 286(40): 34959-34975.
381. Slomiany, B. L. and Slomiany, A. (2002). "Nitric oxide as a modulator of gastric mucin synthesis: role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase activation." *IUBMB Life* 54(5): 267-273.
382. So, L. and Fruman, D. A. (2012). "PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances." *Biochem J* 442(3): 465-468.
383. Somova, L., Moodley, K., Channa, M. L. and Nadar, A. (1999). "Dose-dependent effect of dietary fish-oil (n-3) polyunsaturated fatty acids on in vivo insulin sensitivity in rat." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21(4): 275-278.
384. Song, R. X., McPherson, R. A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R. and Santen, R. J. (2002). "Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation." *Mol Endocrinol* 16(1): 116-127.
385. Song, Y. S., Narasimhan, P., Kim, G. S., Jung, J. E., Park, E.-H. and Chan, P. H. (2008). "The role of Akt signaling in oxidative stress mediates NF-kappaB

- activation in mild transient focal cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(12): 1917-1926.
386. Soskić, S. S., Dobutović, B. D., Sudar, E. M., Obradović, M. M., Nikolić, D. M., Djordjevic, J. D., Radak, D. J., Mikhailidis, D. P. and Isenović, E. R. (2011). "Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure." *Open Cardiovasc Med J.* 5: 153-163.
387. Sreckovic, B., Sreckovic, V. D., Soldatovic, I., Colak, E., Sumarac-Dumanovic, M., Janeski, H., Janeski, N., Gacic, J. and Mrdovic, I. (2017). "Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis." *Diabetes Metab Syndr* 11(3): 179-182.
388. Stanger, O. and Weger, M. (2003). "Interactions of homocysteine, nitric oxide, folate and radicals in the progressively damaged endothelium." *Clin Chem Lab Med* 41(11): 1444-1454.
389. Stanley-Samuelson, D. W. (1987). "Physiological Roles of Prostaglandins and Other Eicosanoids in Invertebrates." *Biol Bull* 173(1): 92-109.
390. Stauffenberg, M. T., Lange, R. A., Hillis, L. D., Cigarroa, J., Hsu, R. M., Devaraj, S. and Jialal, I. (2004). "Hyperhomocysteinemia measured by immunoassay: a valid measure of coronary artery atherosclerosis." *Arch Pathol Lab Med* 128(11): 1263-1266.
391. Stehouwer, C. D. A. (2018). "Microvascular Dysfunction and Hyperglycemia: A Vicious Cycle With Widespread Consequences." *Diabetes* 67(9): 1729-1741.
392. Rask-Madsen, C. and King, G. L. (2013). "Vascular Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Protective Factors." *Cell Metab* 17(1): 20-33.
393. Steinert, J. R., Chernova, T. and Forsythe, I. D. (2010). "Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia." *The Neuroscientist* 16(4): 435-452.
394. Stentz, F. B., Umpierrez, G. E., Cuervo, R. and Kitabchi, A. E. (2004). "Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises." *Diabetes* 53(8): :2079-2086.

395. Stewart, J. C. (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." *Anal Biochem* 104(1): 10-4.
396. Sudar Milovanovic, E., Jovanovic, A., Misirkic-Marjanovic, M., Vucicevic, L., Janjetovic, K. and Isenovic, E. R. (2015). "Effects of Intracerebroventricularly (ICV) Injected Ghrelin on Cardiac Inducible Nitric Oxide Synthase Activity/Expression in Obese Rats." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 123(10): 581-588.
397. Sugita, H., Fujimoto, M., Yasukawa, T., Shimizu, N., Sugita, M., Yasuhara, S., Martyn, J. A. and Kaneki, M. (2005). "Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells." *J Biol Chem* 280(14): 14203-14211.
398. Sugita, H., Kaneki, M., Tokunaga, E., Sugita, M., Koike, C., Yasuhara, S., Tompkins, R. G. and Martyn, J. A. (2002). "Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(2): E386-394.
399. Sun, J., Druhan, L. J. and Zweier, J. L. (2010). "Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production." *Arch Biochem Biophys* 494(2): 130-137.
400. Sun, L., Zhao, L. J., Li, P., Liu, X., Liang, F., Jiang, Y., Kang, N., Gao, C. and Yang, J. (2019). "Effect of hyperbaric oxygen therapy on HMGB1/NF- κ B expression and prognosis of acute spinal cord injury: A randomized clinical trial." *Neuroscience Letters* 692: 47-52.
401. Szabo, C., Southan, G. J. and Thiernemann, C. (1994). "Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12472-12476.
402. Talbot, N. A., Wheeler-Jones, C. P. and Cleasby, M. E. (2014). "Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance." *Mol Cell Endocrinol* 393(1-2): 129-142.

403. Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., et al. (1994). "Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1." *Nature* 372(6502): 182-186.
404. Tanaka, J., Qiang, L., Banks, A. S., Welch, C. L., Matsumoto, M., Kitamura, T., Ido-Kitamura, Y., DePinho, R. A. and Accili, D. (2009). "Foxo1 links hyperglycemia to LDL oxidation and endothelial nitric oxide synthase dysfunction in vascular endothelial cells." *Diabetes* 58(10): 2344-2354.
405. Tani, S., Matsuo, R., Kawauchi, K., Yagi, T., Atsumi, W. and Hirayama, A. (2018). "A cross-sectional and longitudinal study between association of n-3 polyunsaturated fatty acids derived from fish consumption and high-density lipoprotein heterogeneity." *Heart Vessels* 33(5): 470-480.
406. Taylor, B. S., Alarcon, L. H. and Billiar, T. R. (1998). "Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function." *Biochemistry* 63(7): 766-781.
407. Taylor, R. (2012). "Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Diabetes* 61(4): 778-779.
408. Teshigawara, K., Hosaka, T., Yamaguchi, M., Terada, E., Kisyuku, Y., Fukunaga, K., Hirata, Y., Jambaldorj, B., Harada, N., Sakai, T., et al. (2010). "Long-term treatment with hyperbaric air improves hyperlipidemia of db/db mice." *J Med Invest* 57(3-4): 224-231.
409. Thom, S. R. (1989). "Analytic Reviews : Hyperbaric Oxygen Therapy." *J Inte Care Med* 4(2), <https://doi.org/10.1177/088506668900400204>.
410. Thomas, D. D., Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Flores-Santana, W., Switzer, C. r. H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., et al. (2008). "The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling." *Free Radic Biol Med* 45(1): 18-31.
411. Tikhonenko, M., Lydic, T. A., Wang, Y., Chen, W. J., Opreanu, M., Sochacki, A., McSorley, K. M., Renis, R. L., Kern, T., Jump, D. B., et al. (2010). "Remodeling of retinal Fatty acids in an animal model of diabetes: a decrease in long-chain polyunsaturated fatty acids is associated with a decrease in fatty acid elongases Elov12 and Elov14." *Diabetes* 59(1): 219-27.

412. Tirosh, A., Potashnik, R., Bashan, N. and Rudich, A. (1999). "Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation." *J Biol Chem* 274(15): 10595-10602.
413. Tirosh, A., Rudich, A., Potashnik, R. and Bashan, N. (2001). "Oxidative stress impairs insulin but not platelet-derived growth factor signalling in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem J* 355(Pt 3): 757-763.
414. Toborek, M., Barger, S. W., Mattson, M. P., Barve, S., McClain, C. J. and Hennig, B. (1996). "Linoleic acid and TNF-alpha cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells." *J Lipid Res* 37(1): 123-135.
415. Toborek, M., Lee, Y. W., Garrido, R., Kaiser, S. and Hennig, B. (2002). "Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells." *Am J Clin Nutr* 75(1): 119-125.
416. Tomlinson, D. R. (1999). "Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications." *Diabetologia* 42(11): 1271-1281.
417. Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B. and Zak, A. (2011). "Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(2): 117-130.
418. Ueyama, A., Ban, N., Fukazawa, M., Hirayama, T., Takeda, M., Yata, T., Muramatsu, H., Hoshino, M., Yamamoto, M., Matsuo, M., et al. (2016). "Inhibition of MEK1 Signaling Pathway in the Liver Ameliorates Insulin Resistance." *Journal of Diabetes Research* 2016: 8264830.
419. Ulisse, S., Cinque, B., Silvano, G., Rucci, N., Biordi, L., Cifone, M. G. and D'Armiento, M. (2000). "Erk-dependent cytosolic phospholipase A2 activity is induced by CD95 ligand cross-linking in the mouse derived Sertoli cell line TM4 and is required to trigger apoptosis in CD95 bearing cells." *Cell Death Differ* 7(10): 916-924.
420. Unfirer, S., Kibel, A. and Drenjancevic-Peric, I. (2008). "The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus." *Med Hypotheses* 71(5): 776-780.

421. van Dijk, P. R., Logtenberg, S. J. J., Groenier, K. H., Kleefstra, N., Bilo, H. J. G. and Arnqvist, H. J. (2014). "Effect of i.p. insulin administration on IGF1 and IGFBP1 in type 1 diabetes." *Endocr Connect* 3(1): 17-23.
422. Vaneckova, I., Maletinska, L., Behuliak, M., Nagelova, V., Zicha, J. and Kunes, J. (2014). "Obesity-related hypertension: possible pathophysiological mechanisms." *J Endocrinol* 223(3): R63-78.
423. Varma, S., Lal, B. K., Zheng, R., Breslin, J. W., Saito, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W. n. and Durán, W. N. (2005). "Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(4): H1744-1751.
424. Vessby, B., Tengblad, S. and Lithell, H. (1994). "Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men." *Diabetologia* 37(10): 1044-1050.
425. Visona, A., Lusiani, L., Rusca, F., Barbiero, D., Ursini, F. and Pagnan, A. (1989). "Therapeutic, hemodynamic, and metabolic effects of hyperbaric oxygenation in peripheral vascular disease." *Angiology* 40(11): 994-1000.
426. Wald, D. S., Law, M. and Morris, J. K. (2002). "Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis." *BMJ* 325(7374): 1202.
427. Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. (2010). "Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids." *Nutr Rev* 68(5): 280-289.
428. Wanders, A. J., Alssema, M., de Koning, E. J. P., le Cessie, S., de Vries, J. H., Zock, P. L., Rosendaal, F. R., Heijer, M. d. and de Mutsert, R. (2016). "Fatty acid intake and its dietary sources in relation with markers of type 2 diabetes risk: The NEO study." *Eur J Clin Nutr* 71: 245-251.
429. Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z. J., Pankow, J. S. and Eckfeldt, J. H. (2003). "Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." *Am J Clin Nutr* 78(1): 91-98.
430. Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., Jayaprakasam, B., Nair, M. G., Peters, J. M., Busik, J. V., Olson, L. K., et al. (2006). "Regulation of

- hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity." *J Lipid Res* 47(9): 2028-2041.
431. Watanakit, K., Folsom, A. R., Selvin, E., Weatherley, B. D., Pankow, J. S., Brancati, F. L. and Hirsch, A. T. (2005). "Risk factors for peripheral arterial disease incidence in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." *Atherosclerosis* 180(2): 389-397.
432. Wei, X., Song, H., Yin, L., Rizzo, M. G., Sidhu, R., Covey, D. F., Ory, D. S. and Semenkovich, C. F. (2016). "Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes." *Nature* 539(7628): 294-298.
433. Weijers, R. N. M. (2016). "Membrane flexibility, free fatty acids, and the onset of vascular and neurological lesions in type 2 diabetes." *J Diabetes Metab Disord* 15: 13.
434. Welsh, M., Nielsen, D. A., MacKrell, A. J. and Steiner, D. F. (1985). "Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability." *J Biol Chem* 260(25): 13590-13594.
435. Wen, J., Ribeiro, R. and Zhang, Y. (2011). "Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells." *J Neuroinflammation* 8: 38.
436. White, M. F. (2002). "IRS proteins and the common path to diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(3): E413-422.
437. WHO and IDF (2006). "Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia : report of a WHO/IDF consultation." Geneva, Switzerland. p. 50.
438. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* 79(1): 143-180.
439. Wilkinson, D., Chapman, I. M. and Heilbronn, L. K. (2012). "Hyperbaric oxygen therapy improves peripheral insulin sensitivity in humans." *Diabet Med* 29(8): 986-989.

-
440. Wilkinson, D., Nolting, M., Mahadi, M. K., Chapman, I. and Heilbronn, L. (2015). "Hyperbaric oxygen therapy increases insulin sensitivity in overweight men with and without type 2 diabetes." *Diving Hyperb Med* 45(1): 30-36.
441. Williams, S. B., Cusco, J. A., Roddy, M. A., Johnstone, M. T. and Creager, M. A. (1996). "Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J Am Coll Cardiol* 27(3): 567-574.
442. Winter, W. E., Harris, N. and Schatz, D. (2002). "Immunological Markers in the Diagnosis and Prediction of Autoimmune Type 1a Diabetes." *Clinical Diabetes* 20(4): 1916-1921.
443. Wong, R. H. and Sul, H. S. (2010). "Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective." *Curr Opin Pharmacol* 10(6): 684-691.
444. Woo, C. W., Cheung, F., Chan, V. W., Siow, Y. L. and O, K. (2003). "Homocysteine stimulates inducible nitric oxide synthase expression in macrophages: antagonizing effect of ginkgolides and bilobalide." *Mol Cell Biochem* 243(1-2). 37-47.
445. Wortzel, I. and Seger, R. (2011). "The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles." *Genes Cancer* 2(3): 195-209.
446. Wu, T., Dorn, J. P., Donahue, R. P., Sempos, C. T. and Trevisan, M. (2002). "Associations of serum C-reactive protein with fasting insulin, glucose, and glycosylated hemoglobin: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." *Am J Epidemiol* 155(1): 65-71.
447. Xia, C., Rao, X. and Zhong, J. (2017). "Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation." *J Diabetes Res* 2017: 6494795.
448. Xia, Y., Roman, L. J., Masters, B. S. and Zweier, J. L. (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." *J Biol Chem* 273(35): 22635-22639.
449. Xiao, W. (2004). "Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription." *Cell Mol Immunol* 1(6): 425-435.
450. Xiao, Z., Wang, T., Qin, H., Huang, C., Feng, Y. and Xia, Y. (2011). "Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release modulates endothelial nitric-oxide synthase via extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2-mediated serine 635 phosphorylation." *J Biol Chem* 286(22): 20100-20108.

451. Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C. (1994). "Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase." *J Biol Chem* 269(7): 4705-4708.
452. Xu, Q., Wei, Y.-T., Fan, S.-B., Wang, L. and Zhou, X.-P. (2017). "Repetitive hyperbaric oxygen treatment increases insulin sensitivity in diabetes patients with acute intracerebral hemorrhage." *Neuropsychiatr Dis Treat* 13:421-426.
453. Xu, Z., Wang, B. R., Wang, X., Kuang, F., Duan, X. L., Jiao, X. Y. and Ju, G. (2006). "ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase mediate iNOS-induced spinal neuron degeneration after acute traumatic spinal cord injury." *Life Sci* 79(20): 1895-1905.
454. Yamazaki, D., Hitomi, H. and Nishiyama, A. (2018). "Hypertension with diabetes mellitus complications." *Hypertens Res* 41(3): 147-156.
455. Yang, P., Cao, Y. and Li, H. (2010). "Hyperglycemia induces inducible nitric oxide synthase gene expression and consequent nitrosative stress via c-Jun N-terminal kinase activation." *Am J Obstet Gynecol* 203(2): 185.e5-11.
456. Yokoyama, T., Komori, A., Nakamura, M., Takii, Y., Kamihira, T., Shimoda, S., Mori, T., Fujiwara, S., Koyabu, M., Taniguchi, K., et al. (2006). "Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways." *Liver Int* 26(4): 467-476.
457. Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., et al. (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* 277(52): 50230-50236.
458. Yuan, L. J., Ueng, S. W., Lin, S. S., Yeh, W. L., Yang, C. Y. and Lin, P. Y. (2004). "Attenuation of apoptosis and enhancement of proteoglycan synthesis in rabbit cartilage defects by hyperbaric oxygen treatment are related to the suppression of nitric oxide production." *J Orthop Res* 22(5): 1126-1134.
459. Yui, K., Imataka, G., Nakamura, H., Ohara, N. and Naito, Y. (2015). "Eicosanoids Derived From Arachidonic Acid and Their Family Prostaglandins

- and Cyclooxygenase in Psychiatric Disorders." *Curr Neuropharmacol* 13(6): 776-785.
460. Yümün, G., Kahaman, C., Kahaman, N., Yalçınkaya, U., Akçılar, A., Akgül, E. and Vural, A. H. (2016). "Effects of hyperbaric oxygen therapy combined with platelet-rich plasma on diabetic wounds: an experimental rat model." *Arch Med Sci* 12(6): 1370-1376.
461. Zafirovic, S., Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Jovanovic, A., Stanimirovic, J., Stewart, A. J., Pitt, S. J. and Isenovic, E. R. (2017). "17beta-Estradiol protects against the effects of a high fat diet on cardiac glucose, lipid and nitric oxide metabolism in rats." *Mol Cell Endocrinol* 446: 12-20.
462. Zafirovic, S., Sudar-Milovanovic, E., Obradovic, M., Djordjevic, J., Jasnic, N., Borovic, M. L. and Isenovic, E. R. (2019). "Involvement of PI3K, Akt and RhoA in Oestradiol Regulation of Cardiac iNOS Expression." *Curr Vasc Pharmacol* 17(3): 307-318.
463. Zamboni, W. A., Roth, A. C., Russell, R. C., Graham, B., Suchy, H. and Kucan, J. O. (1993). "Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen." *Plast Reconstr Surg* 91(6): 1110-1123.
464. Zanetti, M., Grillo, A., Losurdo, P., Panizon, E., Mearelli, F., Cattin, L., Barazzoni, R. and Carretta, R. (2015). "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Structural and Functional Effects on the Vascular Wall." *BioMed Research International* 2015: 791978.
465. Zaric, B. L., Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Nedeljkovic, J., Lazic, V. and Isenovic, E. R. (2019). "Drug Delivery Systems for Diabetes Treatment." *Curr Pharm Des* 25(2): 166-173.
466. Zhang, B., Li, S. and Harbrecht, B. G. (2011). "Akt-mediated signaling is induced by cytokines and cyclic adenosine monophosphate and suppresses hepatocyte inducible nitric oxide synthase expression independent of MAPK P44/42." *Biochim Biophys Acta* 1813(1): 73-79.
467. Zhang, M. L., Zheng, B., Tong, F., Yang, Z., Wang, Z. B., Yang, B. M., Sun, Y., Zhang, X. H., Zhao, Y. L. and Wen, J. K. (2017). "iNOS-derived peroxynitrite mediates high glucose-induced inflammatory gene expression in vascular smooth

- muscle cells through promoting KLF5 expression and nitration." *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(11): 2821-2834.
468. Zhang, P., Xu, X., Hu, X., van Deel, E. D., Zhu, G. and Chen, Y. (2007). "Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure." *Circulation research* 100(7): 1089-1098.
469. Zhang, Q., Chang, Q., Cox, R. A., Gong, X. and Gould, L. J. (2008). "Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model." *J Invest Dermatol* 128(8): 2102-2112.
470. Zhang, W., Liu, J., Hu, X., Li, P., Leak, R. K., Gao, Y. and Chen, J. (2015). "n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduce Neonatal Hypoxic/Ischemic Brain Injury by Promoting Phosphatidylserine Formation and Akt Signaling." *Stroke* 46(10): 2943-2950.
471. Zhao, J. P., Levy, E., Fraser, W. D., Julien, P., Delvin, E., Montoudis, A., Spahis, S., Garofalo, C., Nuyt, A. M. and Luo, Z. C. (2014). "Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity." *PLoS One* 9(1): e85054.
472. Zhao, J. P., Zhu, Y., Hyun, N., Zeng, D., Uppal, K., Tran, V. T., Yu, T., Jones, D., He, J., Lee, E. T., et al. (2015). "Novel metabolic markers for the risk of diabetes development in American Indians." *Diabetes care* 38(2): 220-227.
473. Zhao, Q. and Lee, F. S. (1999). "Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta." *J Biol Chem* 274(13): 8355-8358.
474. Zhong, J., Gong, Q. and Mima, A. (2017). "Inflammatory Regulation in Diabetes and Metabolic Dysfunction." *J Diabetes Res* 2017: 5165268.
475. Zhou, M.-S., Wang, A. and Yu, H. (2014). "Link between insulin resistance and hypertension: What is the evidence from evolutionary biology?" *Diabetology & metabolic syndrome* 6(1): 12.
476. Zoungas, S., Woodward, M., Li, Q., Cooper, M. E., Hamet, P., Harrap, S., Heller, S., Marre, M., Patel, A., Poulter, N., et al. (2014). "Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and

microvascular complications and death in type 2 diabetes." *Diabetologia* 57(12): 2465-2474.

Biografija autora

Ivana M. Resanović je rođena 29. januara 1986. godine u Kruševcu, Republika Srbija. Medicinsku školu završila je 2005. godine u Kruševcu. Upisala je Biološki fakultet-Univerziteta u Beogradu, smer Ekologija i zaštita životne sredine, školske 2005/06. godine i diplomirala 2011. godine na Katedri za Algologiju, Mikologiju i Lihenologiju, odbranivši diplomski rad pod nazivom: "Primarna produkcija i dinamika fitoplanktona ribnjaka Z7 u Kapetanskom ritu", pod rukovodstvom vanrednog profesora dr Gordane Subakov Simić.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu-Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013. godine, na studijskom programu Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Od 01.04.2013. godine Ivana M. Resanović je zaposlena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“-Univerziteta u Beogradu. Zvanje istraživač saradnik je stekla 18.04.2013. godine i u isto zvanje je reizabrana 11.02.2016. godine, nakon toga je izabrana u zvanje stručni saradnik 08.08.2019. godine. Tema za izradu doktorske disertacije pod naslovom „ Uticaj terapije kiseonikom pod hiperbaričnim uslovima na nivo i sastav masnih kiselina u plazmi, i regulaciju ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze u limfocitima pacijenata sa insulin-zavisnim dijabetesom” odobrena je 25.04.2019. godine od strane Veća naučnih oblasti prirodnih nauka, Univerziteta u Beogradu.

Ivana M. Resanović je trenutno angažovana na projektu: „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja” (br. 173033), čiji je rukovodilac dr Esmar Isenović, naučni savetnik.

U svom dosadašnjem radu bila je koautor na 16 publikacija objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, 8 publikacija objavljenih u časopisima nacionalnog značaja, kao i na 3 saopštenja sa skupova međunarodnog značaja. Glavne oblasti naučno-istraživačkog rada Ivane M. Resanović su: dijabetes, vaskularne komplikacije, kiseonik pod hiperbaričnim uslovima i molekularna endokrinologija.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ивана М. Ресановић _____

Број индекса _____ Б3012/2012 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана М. Ресановић

Број индекса Б3012/2012

Студијски програм Биологија-Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом

Ментори др Божидарка Зарић и др Јелена Ђорђевић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индубилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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