

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dolika D. Vasović

**UTICAJ SKRAĆENOG DNEVNOG IZLAGANJA
SVETLOSTI NA BIHEJVIOURALNE, BIOHEMIJSKE I
MOLEKULARNE PROMENE U MOZGU I RETINI NA
EKSPERIMENTALNOM MODELU DIJABETES
MELITUSA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dolika D. Vasović

**THE IMPACT OF REDUCED DAILY LIGHT
EXPOSURE ON BEHAVIORAL, BIOCHEMICAL, AND
MOLECULAR CHANGES IN THE BRAIN AND
RETINA IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF
DIABETES MELLITUS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025.

MENTORI

1. **Prof. dr Dušan Mladenović**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Prof. dr Olivera Stanojlović**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. **Prof. dr Dragan Hrnčić**, vanredni profesor, predsednik komisije
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Pukovnik prof. dr Miroslav Vukosavljević**, redovni profesor
Vojnomedicinska akademija, Medicinski fakultet
3. **Prof. dr Jelena Milašin**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet
4. **Doc. dr Dejan M. Rašić**, docent
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
5. **Doc. dr Milena Vesković**, docent
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Izrada ove doktorske disertacije bila bi nezamislivo teža bez podrške i saradnje brojnih kolega, prijatelja i mentora. Njihova spremnost da podele svoje znanje, pruže smernice i podstaknu me u trenucima izazova bila je neprocenjiva. Zato želim da izrazim svoju iskrenu zahvalnost:

Neurofiziološkoj laboratoriji Instituta za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan" Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Olivere Stanojlović, na nesebičnoj podršci i motivaciji tokom mog istraživanja. Posebno zahvaljujem prof. dr Draganu Hrnčiću na stručnim savetima i pomoći, kao i doc. dr Nikoli Šutuloviću na dragocenom doprinosu u sprovođenju bihejvioralnih eksperimenata.

Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Tatjane Simić, na podršci tokom istraživanja. Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Mariji Matić i asistentkinji sa doktoratom dr Đurđi Jerotić na dragocenoj pomoći i stručnim smernicama u savladavanju biohemijskih tehnika koje su bile od velikog značaja za ovaj rad.

Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Jelene Milašin. Posebno želim da se zahvalim asistentkinji sa doktoratom dr Jeleni Simonović i višem naučnom saradniku Nađi Nikolić na njihovoj posvećenosti, podršci i dragocenim savetima tokom obavljanja molekularnih analiza.

Višem naučnom saradniku Sanji Ivković i Ani Živanović iz Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Tamari Major sa Farmaceutskog fakulteta, kao i naučnom saradniku Ireni Macuri Jovanović sa Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković," na pomoći u izvođenju i tumačenju imunohistohemijskih analiza važnih za moje istraživanje.

Laboratoriji grupe za ishranu i metabolizam Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom višeg naučnog saradnika Marije Takić, na podršci i stručnim savetima tokom ispitivanja masnih kiselina.

Zahvalnost dugujem doc. dr Mileni Vesković sa Instituta za patološku fiziologiju "Ljubodrag Buba Mihailović" na stručnoj pomoći i podršci koja je značajno doprinela mom istraživanju.

Posebno želim da zahvalim doc. dr Dejanu Rašiću sa Klinike za očne bolesti Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, koji je bio moj klinički mentor. Njegova stručnost i posvećenost, kao i nesebična podrška u trenucima kada je bilo najteže, pružili su mi oslonac i motivaciju da istrajem u radu na doktorskoj disertaciji.

Takođe, izražavam zahvalnost uvaženim članovima komisije, čije su kritike, saveti i podrška bili od velikog značaja za kvalitet i realizaciju ove disertacije.

Dragom mentoru i prijatelju, prof. dr Dušanu Mladenoviću, čije su neizmerno znanje, strpljenje i posvećenost ostavili dubok trag na mom naučnom i profesionalnom razvoju. Njegova sposobnost da prepozna potencijal, pruži podršku i usmeri me u pravom smeru pretvorila je svaki izazov u priliku za učenje i napredak. Njegovi saveti, kritički stav i

neverovatna posvećenost bili su ključni oslonac tokom rada na ovoj disertaciji. Duboko sam zahvalna na privilegiji da učim i napredujem uz takvog mentora i prijatelja.

Svojoj dragoj mentorki, prof. dr Oliveri Stanojlović, čija su neiscrpna energija, neprestana posvećenost i nesebična podrška bile pravi svetionik na mom istraživačkom putu. Njena vera u mene, stručni saveti i nepokolebljiva motivacija nisu samo oblikovali ovu disertaciju, već su me nadahnuli i kao istraživača i kao osobu. Njena posvećenost nauci, ljubav prema podučavanju i iskrena briga za svoje studente učinili su svaki izazov lakšim i svaki uspeh značajnijim. Njena sposobnost da pruži utehu u trenucima sumnje, reči ohrabrenja u trenucima nesigurnosti i inspiraciju kada je bila najpotrebnija ostavila je neizbrisiv pečat na mom radu, mom razvoju i mom pogledu na nauku.

Na kraju, najiskrenija zahvalnost pripada mojoj porodici: mojoj majci Neli, ocu Dragošu i sestri Dariji. Njihova ljubav, podrška i vera u mene bili su stubovi na kojima je počivalo sve što sam postigla. Bez njih, ovaj uspeh ne bi bio moguć. Hvala vam što ste uvek bili uz mene, pružajući mi snagu i inspiraciju kada mi je bila najpotrebnija.

Takođe se zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:

- 1. Kreiranju koncepta teze: prof. dr Dušan Mladenović i prof. dr Olivera Stanojlović*
- 2. Prikupljanju podataka: prof. dr Dragan Hrnčić i doc. dr Nikola Šutulović*
- 3. Analizi rezultata: prof. dr Marija Matić, ass. dr Đurđa Jerotić, ass. dr Jelena Simonović, viši naučni saradnik Nađa Nikolić, doc. dr Dejan Rašić*
- 4. Pomoći u istraživanju: naučni saradnik Irena Macura Jovanović, Ana Živanović, Tamara Major*
- 5. Metodologiji: viši naučni saradnik Marija Takić, viši naučni saradnik Sanja Ivković*
- 6. Superviziji: prof. dr Olivera Stanojlović, prof. dr Dušan Mladenović*
- 7. Pisanju – originalni nacrt: prof. dr Dušan Mladenović, doc. dr Milena Vesković*
- 8. Pisanju- recenzija i uređivanje: prof. dr Dušan Mladenović, prof. dr Olivera Stanojlović, viši naučni saradnik Sanja Ivković*

Doktorska teza je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ugovor br. 451-03-66/2024-03/200110 (Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet), čiji je rukovodilac prof. dr Olivera Stanojlović.

Posvećeno mojim roditeljima

UTICAJ SKRAĆENOG DNEVNOG IZLAGANJA SVETLOSTI NA BIHEJVIORALNE, BIOHEMIJSKE I MOLEKULARNE PROMENE U MOZGU I RETINI NA EKSPERIMENTALNOM MODELU DIJABETES MELITUSA

Sažetak

Dijabetes melitus (DM) je hronični metabolički poremećaj povezan s razvojem brojnih komplikacija, među kojima su dijabetička retinopatija i anksiozno ponašanje. Ove promene često nastaju kao posledica inflamacije, oksidativnog stresa i poremećaja metabolizma lipida. Pokazano je da melatonin, hormon čije je lučenje uslovljeno mrakom, ima potencijal da ublaži ove procese svojim zaštitnim dejstvom.

Cilj ove disertacije bio je da ispita uticaj skraćenog fotoperioda, kao stimulusa za lučenje melatonina, na različite aspekte komplikacija izazvanih DM, uključujući vaskularne promene u retini, inflamaciju, ekspresiju akvaporina 4 (Aqp4), procese vizuelnog ciklusa i metabolizma holesterola u retini i retinalnom pigmentnom epitelu. Takođe, istraživani su efekti na anksiozno ponašanje, oksidativni stres u mozgu, lipidni status i sastav masnih kiselina kod pacova sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom.

Vaskularne promene u retini procenjivane su lektinskim bojenjem, dok je ekspresija gena povezanih sa vizuelnim ciklusom, metabolizmom holesterola i inflamacijom određena qRT-PCR analizom. Anksiozno ponašanje ispitano je testovima podignutog krstastog lavirinta i otvorenog polja. Parametri oksidativnog stresa, lipidni status i sastav masnih kiselina analizirani su u mozgu i serumu korišćenjem standardnih biohemijskih metoda.

Skraćeni fotoperiod smanjio je vaskularne promene i inflamaciju u retini, uz povećanje perivaskularne ekspresije Aqp4 i ubrzanje prometa holesterola u retini. Takođe je ublažio anksiozno ponašanje, smanjio lipidnu peroksidaciju u mozgu i smanji koncentracije oleinske, vakuenske, dihomogama-linolenske i dokozaheksaenoinske kiseline u serumu. Ovi rezultati ukazuju na potencijal skraćenog fotoperioda kao strategije za ublažavanje komplikacija izazvanih dijabetesom.

Ključne reči: dijabetes melitus, skraćeni fotoperiod, melatonin, akvaporin 4, inflamacija, oksidativni stres, vizuelni ciklus, metabolizam holesterola, anksiozno ponašanje

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj: _____

THE IMPACT OF REDUCED DAILY LIGHT EXPOSURE ON BEHAVIORAL, BIOCHEMICAL, AND MOLECULAR CHANGES IN THE BRAIN AND RETINA IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETES MELLITUS

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder linked to complications like diabetic retinopathy and anxiety-like behavior, driven by inflammation, oxidative stress, and disrupted lipid metabolism. Melatonin, a hormone secreted in darkness, has shown protective potential against these processes.

This thesis aimed to assess the effects of a shortened photoperiod, stimulating melatonin secretion, on DM-related complications, including retinal vascular changes, inflammation, Aqp4 expression, visual cycle, and cholesterol metabolism in the retina and retinal pigment epithelium. Additional effects on anxiety-like behavior, brain oxidative stress, lipid status, and fatty acid composition were also evaluated in streptozotocin-induced diabetic rats.

Retinal vascular changes were analyzed with lectin staining, while qRT-PCR determined gene expression for the visual cycle, cholesterol metabolism, and inflammation. Anxiety-like behavior was assessed using the elevated plus maze and open-field tests, and oxidative stress, lipid status, and fatty acid composition were measured in the brain and serum using biochemical methods.

A shortened photoperiod reduced vascular changes and inflammation in the retina, increased perivascular expression of Aqp4, and accelerated cholesterol turnover in the retina. It also alleviated anxiety-like behavior, reduced lipid peroxidation in the brain, and decreased concentrations of oleic, vaccenic, dihomo- γ -linolenic, and docosahexaenoic acids in the serum. These findings highlight the potential of a shortened photoperiod as a strategy for mitigating diabetes-induced complications.

Keywords: diabetes mellitus, shortened photoperiod, melatonin, aquaporin 4, inflammation, oxidative stress, visual cycle, cholesterol metabolism, anxiety-like behavior

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Physiological Sciences

UDC number: _____

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Dijabetes melitus	2
1.1.1. Klasifikacija dijabetes melitusa	2
1.1.2. Epidemiologija.....	5
1.1.3. Komplikacije dijabetes melitusa	5
1.2. Uloga glukoze u normalnom funkcionisanju mozga	6
1.3. Uticaj dijabetes melitusa na razvoj anksioznosti i kognitivnih poremećaja	7
1.3.1. Poremećaji neurotransmisije u sklopu anksioznosti i kognitivnih poremećaja	7
1.3.2. Uloga insulinske rezistencije u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja	8
1.3.3. Uloga oksidativnog stresa i poremećaja metabolizma lipida u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja.....	9
1.3.4. Uloga neuroinflamacije u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja.....	11
1.4. Anatomija retine	11
1.4.1. Krvno-retinalna barijera.....	13
1.4.1.1. Unutrašnja krvno-retinalna barijera	14
1.4.1.2. Spoljašnja krvno-retinalna barijera	14
1.4.2. Retinalni pigmentni epitel.....	14
1.4.3. Sloj fotoreceptora.....	15
1.4.4. Milerove ćelije	16
1.5. Dijabetička retinopatija.....	16
1.5.1. Poremećaj metabolizma glukoze i razvoj dijabetičke retinopatije	17
1.5.2. Alternativni metabolički putevi u uslovima hiperglikemije	19
1.5.2.1. Poliolski put.....	20
1.5.2.2. Heksozaminski put	21
1.5.2.3. Signalni put protein kinaze C	22
1.5.2.4. Uloga AGE u razvoju dijabetičke retinopatije	23
1.5.3. Poremećaj metabolizma lipida u sklopu dijabetičke retinopatije	23
1.6. Vizuelni ciklus.....	24
1.7. Cirkadijalni ritam.....	25
1.7.1. Cirkadijalni ritam i poremećaj metabolizma glukoze	26
1.7.2. Periferni časovnik u retini	27
1.8. Melatonin.....	27
1.8.1. Sintaza melatonina u retini.....	29

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJAL I METODE	33
3.1. Eksperimentalne životinje	34
3.2. Eksperimentalni protokol	34
3.3. Bihevioralni testovi	35
3.3.1. Uzdignuti krstasti lavirint	35
3.3.2. Test otvorenog polja	36
3.4. Imunohistohemijska analiza	37
3.5. Određivanje ekspresije gena	37
3.6. Biohemijske analize	39
3.6.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa	39
3.6.2. Određivanje lipida i masnih kiselina	39
3.7. Statistička analiza	39
4. REZULTATI	41
4.1. Koncentracija glukoze u krvi i melatonina u serumu	42
4.2. Bihevioralni testovi	43
4.2.1. Test uzdignutog krstastog lavirinta	43
4.2.2. Test otvorenog polja	44
4.3. Oksidativni stres	46
4.4. Status lipida i koncentracija metil estara masnih kiselina	49
4.5. Smanjena dnevna izloženost svetlosti ublažava vaskulopatiju u retini pacova tretiranih STZ-om	51
4.6. Smanjena dnevna izloženost svetlosti smanjuje ekspresiju Aqp4 u retini, ali povećava perivaskularnu ekspresiju Aqp4 kod pacova tretiranih STZ-om	53
4.7. Smanjena dnevna izloženost svetlosti smanjuje gliozu i ekspresiju proinflamatornih citokina IL-1 i TNF- α u retini i RPE pacova	55
4.8. Smanjena dnevna izloženost svetlosti ubrzava vizuelni ciklus u RPE sloju i metabolizam holesterola u retini kod pacova tretiranih STZ-om	56
5. DISKUSIJA	59
6. ZAKLJUČCI	71
7. LITERATURA	74

1. UVOD

1.1. Dijabetes melitus

Dijabetes melitus (lat. diabetes mellitus, DM) predstavlja hronični metabolički poremećaj koji se karakteriše hiperglikemijom uslovljenom smanjenom sekrecijom insulina, insulinskom rezistencijom ili istovremenim prisustvom oba poremećaja (Harreiter i sar. 2023). Ovo stanje dovodi do povišenog nivoa glukoze u krvi (hiperglikemija), što može izazvati ozbiljne zdravstvene komplikacije. DM se javlja u različitim oblicima, od kojih svaki ima specifične uzroke i karakteristike.

1.1.1. Klasifikacija dijabetes melitusa

Tip 1 dijabetes melitus (T1DM) predstavlja autoimuno oboljenje koje se karakteriše destrukcijom beta ćelija pankreasa od strane imunološkog sistema. Beta ćelije pankreasa su odgovorne za proizvodnju insulina, hormona koji pomaže u regulaciji nivoa glukoze u krvi (Harreiter i sar. 2023). Kada se beta ćelije unište, telo gubi sposobnost da proizvodi insulin, što dovodi do apsolutnog nedostatka insulina. Tačan uzrok T1DM nije potpuno razjašnjen, ali se pretpostavlja da kombinacija genetskih i faktora životne sredine poput prethodnih virusnih infekcija i ishrane u ranom detinjstvu igra ključnu ulogu (Petersmann i sar. 2019). Simptomi T1DM često se razvijaju brzo i uključuju poliuriju, polidipsiju, polifagiju, neočekivani gubitak telesne mase, konstantni umor, osećaj slabosti i zamagljen vid. Dijagnoza se postavlja na osnovu testova nivoa glukoze u krvi, vrednosti HbA1c testa koji odražava prosečan nivo glukoze u krvi tokom poslednja tri meseca, testova na autoantitela i prisustva ketona u urinu ili krvi (Petersmann i sar. 2019, González-Morales i sar. 2020). Lečenje zahteva doživotnu terapiju insulinom, redovno praćenje nivoa glukoze, dijetetske promene i fizičku aktivnost.

Tip 2 dijabetes melitus (T2DM) je najčešći oblik dijabetesa, karakterisan insulinskom rezistencijom i relativnim nedostatkom insulina (Sasako i sar. 2023). Na početku bolesti, pankreas kompenzuje povećanom proizvodnjom insulina kako bi nadoknadio insulinsku rezistenciju, ali vremenom ne može održati ovu povećanu proizvodnju, što dovodi do hiperglikemije. T2DM se najčešće razvija kod odraslih starijih od 45 godina, ali se sve češće javlja i kod mlađih osoba, uključujući adolescente, zbog sve veće stope gojaznosti i fizičke neaktivnosti (Contreras-Zentella i sar. 2024). Uzroci i faktori rizika za razvoj T2DM uključuju genetsku predispoziciju, prekomernu telesnu težinu, sedentarni način života, nezdravu ishranu bogatu kalorijama i mastima, kao i starost. Dodatno, određene etničke grupe, kao što su Afroamerikanci, Latinoamerikanci, Indijanci i Azijati, imaju povećan rizik za razvoj ove bolesti (Wu i sar. 2021, Qiu i sar. 2022). Simptomi T2DM se razvijaju postepeno i mogu uključivati povećano mokrenje, povećanu žeđ, povećan apetit, gubitak težine, zamagljen vid, umor i rane na telu koje sporo zarastaju. Lečenje T2DM je usmereno na kontrolu nivoa glukoze u krvi, smanjenje rizika od komplikacija i poboljšanje kvaliteta života. Promene načina života, kao što su zdrava ishrana, redovna fizička aktivnost i održavanje zdrave telesne mase, ključni su za upravljanje bolešću. Terapija lekovima često uključuje oralne hipoglikemike kao što su metformin, preparati sulfonilureje, DPP-4 inhibitori, SGLT2 inhibitori i drugi. U nekim slučajevima, naročito kada oralni lekovi nisu dovoljni za postizanje kontrole glikemije, neophodna je terapija insulinom. Kontinuirano praćenje nivoa glukoze u krvi, krvnog pritiska i nivoa lipida takođe je važno za prevenciju komplikacija.

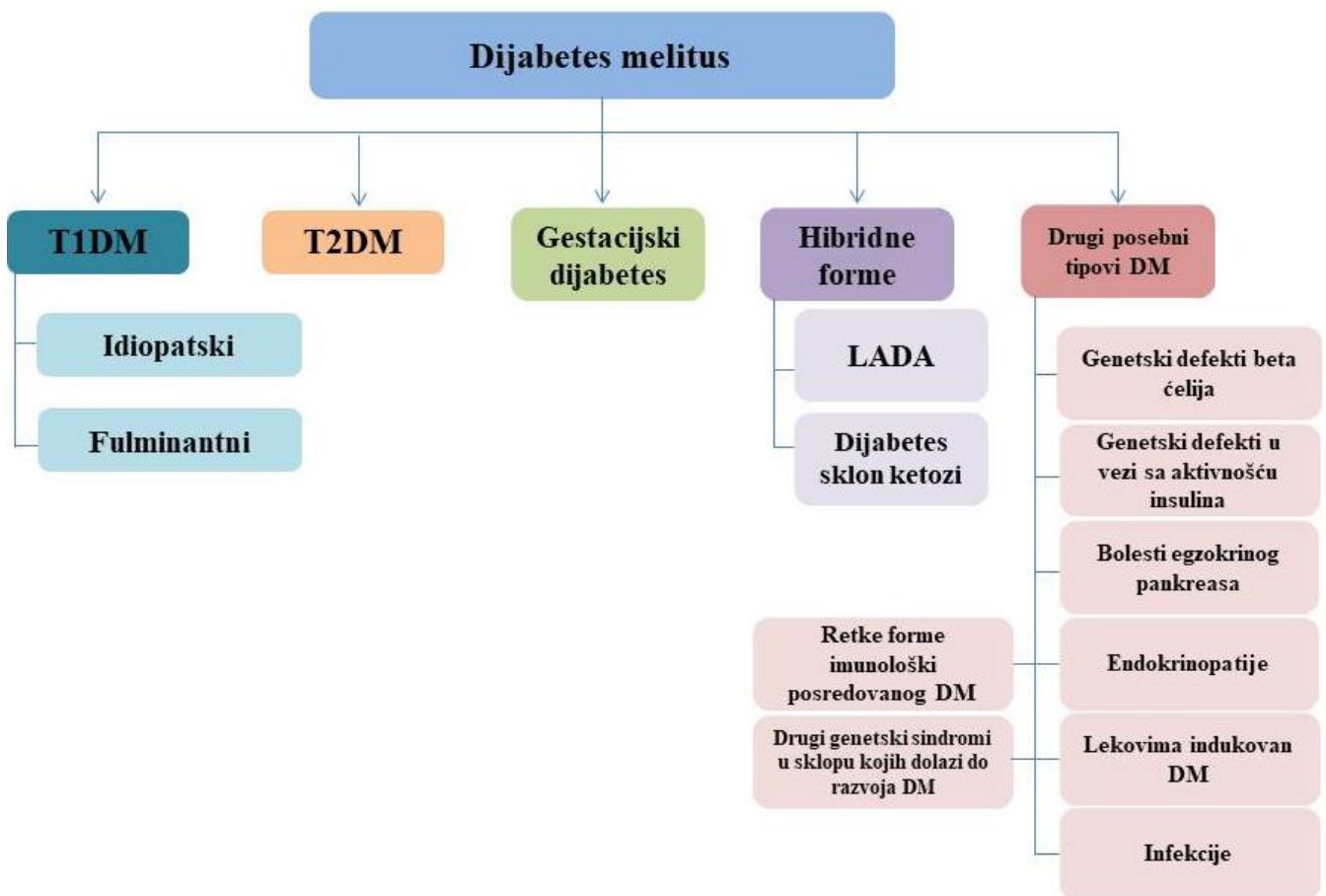
Gestacijski dijabetes melitus (GDM) je specifičan oblik dijabetesa koji se prvi put dijagnostikuje tokom trudnoće (Ye i sar. 2022). Ovo stanje se javlja kada telo trudnice ne

može proizvesti dovoljno insulina da zadovolji povećane potrebe koje su posledica hormonalnih promena. Tokom trudnoće, posteljica proizvodi hormone koji pomažu u održavanju trudnoće, ali neki od ovih hormona čine ćelije otpornijim na insulin (insulinska rezistencija) (Sweeting i sar. 2022). Kako trudnoća napreduje, posteljica proizvodi sve više hormona, što dodatno povećava insulinsku rezistenciju. Ako pankreas ne može proizvesti dovoljno insulina da prevaziđe ovaj efekat, nivo glukoze u krvi raste, što dovodi do gestacijskog dijabetesa. Faktori rizika za razvoj GDM uključuju starost majke (starije od 25 godina), prekomernu telesnu masu, pozitivnu porodičnu anamnezu, prethodni gestacijski dijabetes, prethodno rođenje krupnog deteta (više od 4 kg) i određene etničke grupe poput Afroamerikanaca, Latinoamerikanaca, Indijanaca i Azijata (Ye i sar. 2022). Simptomi gestacijskog dijabetesa su slični simptomima drugih tipova dijabetesa i mogu uključivati povećanu žeđ, učestalo mokrenje, umor i zamagljen vid, ali često nema očiglednih simptoma. Dijagnoza se obično postavlja između 24. i 28. nedelje trudnoće putem testa opterećenja glukozom (oralni test tolerancije na glukozu) (Sweeting i sar. 2022). Lečenje gestacijskog dijabetesa uključuje promene u ishrani, redovnu fizičku aktivnost, praćenje nivoa glukoze u krvi i, u nekim slučajevima, terapiju insulinom ili oralnim lekovima ako promene načina života nisu dovoljne za kontrolu nivoa glukoze. Trudnice sa GDM-om se podstiču da jedu uravnotežene obroke sa niskim sadržajem šećera i visokim sadržajem vlakana, da se bave redovnim vežbanjem koje je bezbedno tokom trudnoće, i da redovno prate nivo glukoze u krvi kako bi se osigurala adekvatna kontrola. Nakon porođaja, gestacijski dijabetes obično nestaje, ali žene koje su imale GDM imaju povećan rizik od razvoja T2DM kasnije u toku života, pa se preporučuje redovno praćenje nivoa glukoze i održavanje zdravih životnih navika. Gestacijski dijabetes može povećati rizik od komplikacija tokom trudnoće i porođaja, kao što su preeklampsija, prevremeni porođaj i potreba za carskim rezom, kao i rizik od makrosomije (velika težina novorođenčeta), što može dovesti do povreda tokom porođaja (Sweeting i sar. 2022). Redovno praćenje i adekvatna kontrola gestacijskog dijabetesa ključni su za smanjenje ovih rizika i osiguranje zdravlja majke i bebe.

Predijabetes je stanje u kom su nivoi glukoze u krvi viši od normalnog, ali ne dovoljno visoki da bi se postavila dijagnoza dijabetesa i predstavlja jedan od faktora rizika za razvoj T2DM (de Wit-Verheggen i van de Weijer 2021). Osobe sa predijabetesom imaju povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti i drugih komplikacija povezanih sa dijabetesom. Predijabetes često nema očigledne simptome, pa mnogi ljudi nisu svesni da ga imaju. Često se može zaustaviti promenama načina života kao što su gubitak telesne mase, povećana fizička aktivnost i zdrava ishrana. Gubitak čak i manjeg procenta telesne mase (5-7%) može značajno smanjiti rizik od razvoja T2DM (Rondanelli i sar. 2023). Redovna fizička aktivnost, kao što je hodanje najmanje 150 minuta nedeljno, može poboljšati insulinsku senzitivnost i pomoći u kontroli glikemije. Zdrava ishrana koja uključuje smanjenje unosa šećera i rafiniranih ugljenih hidrata, povećanje unosa vlakana, voća, povrća i integralnih žitarica, može pomoći u održavanju glikemije u fiziološkim granicama.

Drugi specifični tipovi dijabetesa uključuju retke oblike dijabetesa koji nastaju zbog specifičnih genetskih poremećaja, hirurških zahvata, lekova, infekcija, bolesti pankreasa i drugih oboljenja. Na primer, monogeniski dijabetes je oblik dijabetesa uzrokovan mutacijama u jednom genu, a najpoznatiji oblici su MODY (eng. *maturity onset diabetes of the young*) i neonatalni dijabetes (Sousa i sar. 2022). MODY se obično javlja kod mladih osoba i često se nasleđuje autozomno dominantno. Neonatalni dijabetes se javlja u prvim mesecima života. Postoje i oblici dijabetesa povezani sa bolesti pankreasa kao što su pankreatitis, karcinom pankreasa ili cistična fibroza (Yamamoto-Kataoka i sar. 2021). Kod ovih stanja, oštećenje pankreasa može dovesti do smanjene proizvodnje insulina. Hirurški zahvati poput pankreatektomije (uklanjanje pankreasa) takođe mogu uzrokovati dijabetes zbog gubitka

insulinskih ćelija. Dijabetes izazvan lekovima može biti uzrokovan upotrebom određenih lekova koji utiču na metabolizam glukoze. Na primer, glukokortikoidi, često korišćeni za lečenje zapaljenskih oboljenja, mogu izazvati hiperglikemiju i dijabetes. Drugi lekovi koji mogu izazvati dijabetes uključuju neke antipsihotike i lekove za lečenje HIV-a. Infekcije mogu imati ulogu u razvoju dijabetesa. Na primer, infekcija citomegalovirusom ili nekim drugim virusima može oštetiti pankreas i izazvati dijabetes. Takođe, hormonski poremećaji kao što su Cushingov sindrom, akromegalija, feohromocitom i glukagonom mogu dovesti do dijabetesa zbog povećane proizvodnje hormona koji antagonizuju efekat insulina. LADA (eng. *latent autoimmune diabetes in adults*) je još jedan specifičan tip dijabetesa koji se često pogrešno dijagnostikuje kao T2DM (Hu i sar. 2022). LADA je oblik autoimunskog dijabetesa koji se razvija sporije od tipičnog T1DM i obično se javlja kod odraslih. Osim ovih, postoje i drugi ređi oblici dijabetesa kao što su dijabetes izazvan genetskim sindromima poput Downovog sindroma, Klinefelterovog sindroma i Turnerovog sindroma. Upravljanje ovim specifičnim tipovima dijabetesa može zahtevati poseban pristup i često uključuje multidisciplinarni tim lekara kako bi se osigurao najbolji mogući ishod za pacijenta (Slika 1.1.).



Slika 1.1. Nova klasifikacija dijabetesa melitusa

Različiti tipovi i podtipovi DM uključujući tip 1 dijabetes (T1DM), tip 2 dijabetes (T2DM), gestacijski dijabetes, hibridne forme dijabetesa (LADA i dijabetes sklon ketozi), druge posebne tipove DM.

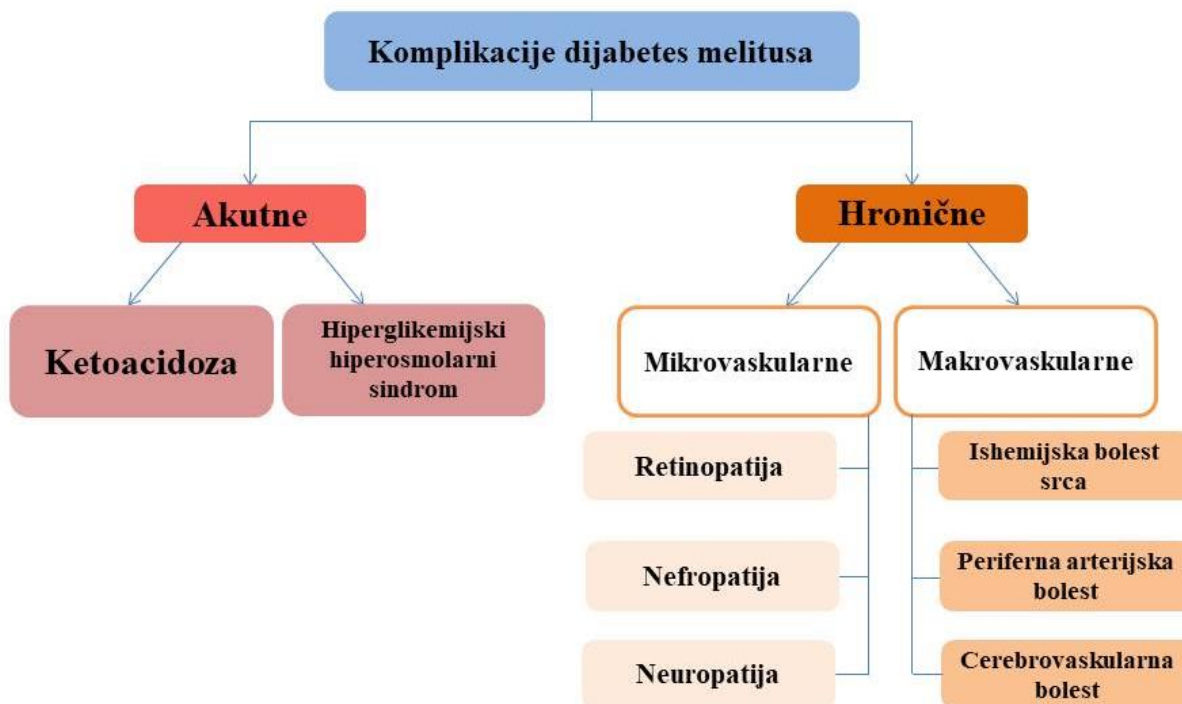
1.1.2. Epidemiologija

DM predstavlja globalni zdravstveni problem sa dramatičnim porastom prevalencije širom sveta. Prema podacima Međunarodne federacije za dijabetes (IDF), u 2021. godini oko 537 miliona odraslih osoba (između 20 i 79 godina) živelo je sa dijabetesom, što čini 10,5% svetske populacije (Sun i sar. 2022). Očekuje se da će se ovaj broj povećati na 643 miliona do 2030. godine i na 783 miliona do 2045. godine (Sun i sar. 2022). Najveća stopa dijabetesa zabeležena je u regijama poput Bliskog Istoka, Severne Afrike i Južne Azije, gde faktori kao što su urbani način života, nezdrava ishrana i manjak fizičke aktivnosti doprinose povećanju broja obolelih. Genetski faktori, starost, gojaznost, fizička neaktivnost, nezdrava ishrana i socio-ekonomski status su glavni faktori rizika za razvoj T2DM.

1.1.3. Komplikacije dijabetes melitusa

Dijabetes predstavlja značajno opterećenje za zdravstvene sisteme zbog visokih troškova lečenja i brojnih komplikacija koje uključuju kardiovaskularne bolesti, kao što su srčani i moždani udar, koji su vodeći uzroci smrti kod osoba sa dijabetesom. Komplikacije dijabetesa melitusa mogu se podeliti na akutne i na hronične. Akutne komplikacije, kao što su dijabetička ketoacidoza i hiperglikemijski hiperosmolarni sindrom, predstavljaju hitna stanja i zahtevaju brzu medicinsku intervenciju. Hronične komplikacije se dele na mikrovaskularne i makrovaskularne (Tomić i sar. 2022, Darenskaya i sar. 2021). Mikrovaskularne komplikacije uključuju dijabetičku retinopatiju, nefropatiju i neuropatiju, dok makrovaskularne obuhvataju kardiovaskularne bolesti i perifernu arterijsku bolest koja često rezultira amputacijama usled loše cirkulacije i pratećih infekcija (Slika 1.2.). Druge česte komplikacije kod osoba sa dijabetesom uključuju gastrointestinalne simptome, seksualne disfunkcije, kao i kožne probleme, poput infekcija i sporog zarastanja rana.

Tehnološki napredak, kao što su kontinuirani monitoring glukoze (CGM) i insulinske pumpe, značajno olakšava dijagnozu i terapiju dijabetesa i doprinosi poboljšanju kvaliteta života obolelih (Antar i sar. 2023). Međutim, uprkos ovim naprecima, globalna prevalencija dijabetesa nastavlja da raste, što ukazuje na potrebu za dodatnim naporima u prevenciji, edukaciji i pristupu zdravstvenoj zaštiti. Osim toga, psihološke komplikacije, uključujući anksioznost i depresiju, često prate dijabetes, dodatno opterećujući obolele i njihove porodice. Stoga je neophodno holistički pristupiti lečenju dijabetesa, uzimajući u obzir sve aspekte bolesti, kako fizičke, tako i mentalne.



Slika 1.2. Komplikacije u sklopu dijabetes melitusa

Komplikacije u sklopu dijabetes melitusa mogu se podeliti na akutne i na hronične komplikacije. Akutne komplikacije obuhvataju ketoacidozu i hiperglikemijski hiperosmolarni sindrom (HHS). Hronične komplikacije se dalje dele na mikrovaskularne i makrovaskularne komplikacije koje pogađaju različite organe i organske sisteme. Mikrovaskularne komplikacije najčešće obuhvataju promene na očima i bubrezima u sklopu dijabetičke retinopatije i dijabetičke nefropatije dok makrovaskularne promene obuhvataju promene na mozgu, srcu i na ekstremitetima.

1.2. Uloga glukoze u normalnom funkcionisanju mozga

Glukoza je neophodna za održavanje normalnih fizioloških procesa u mozgu. Iako obuhvata svega 2% ukupne telesne mase, mozak troši oko 20% energije koja se dobija iz glukoze što predstavlja oko 5,6 mg glukoze na 100 g moždanog tkiva u minuti (Thakur i sar. 2019, Manza i sar. 2020). Metabolizam glukoze obezbeđuje gorivo za obavljanje normalnih fizioloških procesa produkcijom adenzin trifosfata (ATP) koji predstavlja osnov za održavanje normalne funkcije neurona i formiranje neurotransmitera (Manza i sar. 2020). Biosinteza amino kiselina, monosaharida i kompleksnih ugljenih hidrata esencijalna je za proces neurotransmisije i obnovu makromolekula, a zahteva korišćenje glukoze kao izvora ugljenika.

Triptofan i tirozin predstavljaju amino kiseline neophodne za sintezu monoaminskih neurotransmitera. Triptofan je prekursor serotonina (5-HT), dok je tirozin prekursor dopamina i noradrenalina (Dienel 2019). Glikoliza (proces u kom se glukoza metaboliše do piruvata) i oksidativni metabolizam (u kom se piruvat metaboliše do ugljen dioksida) putem ciklusa trikarboksilnih kiselina i elektronskog transportnog lanca predstavljaju glavne puteve proizvodnje energije u mozgu (Dienel 2019, Manza i sar. 2020). Neuromodulatori i neurotransmiteri moraju biti endogeno produkovani iz supstrata dobijenih iz ovih puteva, jer je transport neuroaktivnih komponenti iz krvi u mozak ograničen postojanjem visoko selektivne krvno-moždane barijere (Dienel 2019).

1.3. Uticaj dijabetesa melitusa na razvoj anksioznosti i kognitivnih poremećaja

Dijabetička encefalopatija podrazumeva niz promena koje se javljaju u mozgu usled hronične hiperglikemije. Neurokognitivne promene kod dijabetičara povezane su sa smanjenjem volumena bele i sive mase mozga, pri čemu se ovi efekti naročito manifestuju kod dužeg trajanja hiperglikemije, ranog početka bolesti ili učestalih epizoda teške hiperglikemije (Luna i sar. 2021). Istraživanja pokazuju smanjenje volumena sive mase u regijama kao što su temporalni režanj, parahipokampalni girus, insularni korteks i angularni girus, koji imaju ključnu ulogu u memoriji, pažnji i obradi govora (Luna i sar. 2021). Kod dijabetesa dolazi i do poremećaja memorije formirane u hipokampusu, usled smanjene hipokampalne neuroplastičnosti, što dalje ometa sposobnost mozga da se adaptira i reorganizuje obrasce ponašanja i emocionalnih funkcija, uključujući pojavu anksioznosti (Luna i sar. 2021). Gubitak neurona u hipokampusu je povezan sa povećanim oksidativnim stresom, a dentatni girus i Amonov rog, kao najosetljivije zone, pokazuju smanjenje gustine dendrita, sinaptičkih proteina i porast markera apoptoze, uz poremećaj hipokampalne neurogeneze (Luna i sar. 2021). Ove promene, uz narušenu neuroplastičnost, doprinose razvoju kognitivnih poremećaja, problema sa učenjem, pamćenjem, ali i emocionalnim disbalansom, što povećava rizik od anksioznosti (Luna i sar. 2021).

1.3.1. Poremećaji neurotransmisije u sklopu anksioznosti i kognitivnih poremećaja

Dopamin, noradrenalin i 5-HT predstavljaju tri ključna monoaminska neurotransmitera koja igraju važnu ulogu u razvoju anksioznih i depresivnih poremećaja (Thakur i sar. 2019, Luna i sar. 2021). Prema "monoaminskoj hipotezi", glavni simptomi anksioznosti i depresije povezani su sa deficitom ovih monoaminergičkih transmitera, što dovodi do promena u raspoloženju, smanjenoj motivaciji i pojačanom osećaju uzbuđenja i straha. Dopamin, pored uloge u regulaciji raspoloženja, ključan je za procese motivacije i nagrađivanja. Smanjena dopaminska aktivnost kod anksioznih poremećaja može dodatno otežati motivaciju i angažovanje, što pojačava osećaj nemira i neizvesnosti (Casado-Sainz i sar. 2022).

U modulaciji anksioznog obrasca ponašanja u amigdali, osim gama-aminobuterne kiseline (GABA), učestvuju i drugi neurotransmiteri kao što su serotonin, opioidni peptidi, endokanabinoidi, neuropeptid Y, oksitocin i kortikotropin-oslobađajući hormon (Thakur i sar. 2019, Xia i sar. 2021). GABA, kao glavni inhibitorski neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu, pomaže u regulaciji neuronske aktivnosti. Delovanjem na GABA-A receptore, GABA omogućava prolaz hloridnih jona kroz postsinaptičke membrane, čime dovodi do hiperpolarizacije neurona i smanjuje njihovu ekscitabilnost. Na taj način, GABA funkcioniše kao "kočnica" za prekomerno neuralno uzbuđenje, stabilizujući nervni sistem i smanjujući mogućnost prekomernih i neprikladnih odgovora (Xia i sar. 2021). Smanjena aktivnost GABA-e kod osoba sa anksioznim poremećajima može doprineti osećaju nemira i pojačanoj reaktivnosti na stresne situacije.

Noradrenalin ima centralnu ulogu u odgovoru organizma na stres, pripremajući telo za "bori se ili beži" reakciju. Hronično povišeni nivoi noradrenalina u anksioznim poremećajima mogu doprineti osećaju prekomerne uzbuđenosti i pojačanoj reaktivnosti, dok iscrpljivanje noradrenalinskih rezervi usled produženog stresa dodatno pogoršava simptome anksioznosti (Xia i sar. 2021). Takođe, serotonin ima ključnu funkciju u stabilizaciji emocionalnih stanja. Smanjeni nivoi serotonina u anksioznosti ne samo da narušavaju emocionalnu stabilnost, već

moгу dovesti do poteškoća sa pažnjom, radnom memorijom i donošenjem odluka, čime dodatno pojačavaju simptome anksioznosti (Xia i sar. 2021).

Endokanabinoidni sistem, koji takođe učestvuje u regulaciji raspoloženja i odgovora na stres, pomaže mozgu da smanji prekomerne reakcije na stresne nadražaje (Xia i sar. 2021). Disbalans u ovom sistemu povećava rizik od anksioznosti, dodatno narušavajući emocionalnu stabilnost i kognitivne funkcije kod osoba sklonih anksioznim poremećajima.

1.3.2. Uloga insulinske rezistencije u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja

Insulinska rezistencija ima ključnu ulogu u razvoju kognitivnih poremećaja i anksioznosti, posebno kod osoba obolelih od dijabetes melitusa. Ovaj proces uključuje smanjenje osetljivosti receptora za insulin na insulinsku signalizaciju, što dovodi do disfunkcije presinaptičkih i postsinaptičkih neurona (Thakur i sar. 2019). Insulinska rezistencija ometa signalni put fosfatidilinozitol 3-kinaze/ proteinske kinaze B (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B pathway*, PI3K/AKT), čiji poremećaj rezultuje hiperfosforilacijom tau proteina i akumulacijom neurotoksičnih amiloid- β plakova ($A\beta$) u mozgu. Ovi procesi su karakteristični za neurodegenerativne promene i povezani su sa kognitivnim oštećenjima i razvojem simptoma anksioznosti (Li i sar. 2023, Thakur i sar. 2019).

Povećan oksidativni stres, prisutan kao posledica insulinske rezistencije, aktivira niz signalnih puteva, uključujući nuklearni faktor kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B), kinazu N-terminalnog regiona c-Jun-a (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK) i stres-aktivirane protein kinaze (engl. *stress-activated protein kinase*, SAPK), kao i MAP kinazu p38, što sve doprinosi disfunkciji β -ćelija. Ove promene na kraju narušavaju sinaptičku funkciju i dodatno pogoršavaju insulinsku rezistenciju (Li i sar. 2023). Aktivacija proinflamatornih citokina poput faktora nekroze tumora-alfa (engl. *tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α), interleukina 1-beta (engl. *interleukin 1-beta*, IL-1 β) i interleukina 6 (engl. *interleukin 6*, IL-6) dodatno inhibira insulinske receptore i povećava produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), pojačavajući inflamaciju i neurotoksičnost.

Uz to, hronična inflamacija uzrokovana insulinskom rezistencijom povećava aktivnost NF- κ B signalnog puta, čime doprinosi daljem porastu oksidativnog stresa i oštećenju sinaptičkih funkcija. U ovom procesu, defosforilacija kofilina dovodi do depolimerizacije aktina, čime se smanjuje veličina i gustina dendritskih spina, što dodatno narušava neuronske veze u mozgu (Almarghalani i sar. 2023). Ovi mehanizmi direktno utiču na sinaptičku plastičnost i kognitivne funkcije, dok istovremeno povećavaju rizik od razvoja anksioznosti, budući da utiču na neuronske mreže odgovorne za emocionalnu regulaciju i pamćenje.

Promene u mozgu koje obuhvataju oksidativni stres, inflamaciju, hiperfosforilaciju tau proteina i akumulaciju $A\beta$ međusobno su povezane i doprinose progresivnom oštećenju neuronskih funkcija. Produkti glikacije dodatno intenziviraju oksidativni stres, dok insulinska rezistencija pospešuje mitohondrijalnu disfunkciju, što dodatno pogoršava stanje. Krajnji rezultat ovih složenih procesa je hronična inflamacija i narušena sinaptička funkcija, što predstavlja osnovu za razvoj anksioznosti i kognitivnih poremećaja kod osoba s dijabetesom.

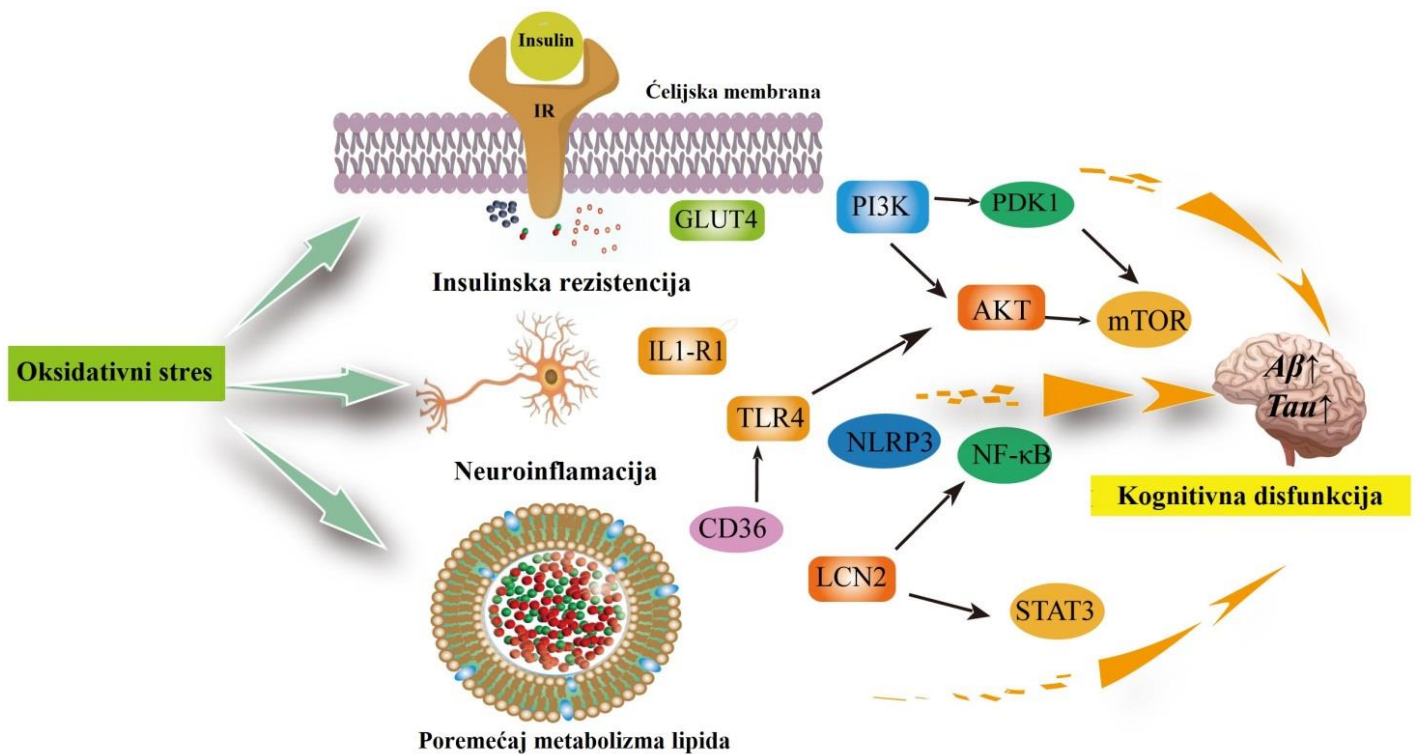
1.3.3. Uloga oksidativnog stresa i poremećaja metabolizma lipida u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja

Povećanje oksidativnog stresa i lipidna peroksidacija povezani su sa razvojem kognitivne disfunkcije i anksioznosti kod dijabetičara. Jedna od najznačajnijih hipoteza koja podržava razvoj neurodegeneracije je amiloidna hipoteza, koja se bazira na činjenici da nesolubilne A β partikule dovode do preterane fosforilacije tau proteina, što dalje izaziva produkciju slobodnih radikala, inflamaciju i oksidativno oštećenje. Takvi procesi nisu samo osnova za kognitivne poremećaje, već mogu pospešiti i razvoj simptoma anksioznosti, budući da oksidativni stres utiče na neurone i sinaptičke veze povezane sa emocionalnom regulacijom.

Protein 1 povezan sa receptorom lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*, LRP1) uključen je u eliminaciju A β peptida, a oksidacija ovog receptora može dovesti do nakupljanja A β u mozgu (Li i sar. 2023). Visoke koncentracije ROS dodatno povećavaju lipidnu peroksidaciju u mozgu, menjaju propustljivost membrane i funkciju membranskih receptora i enzima. Lipidna peroksidacija proizvodi aktivne aldehide, kao što su malondialdehid (eng. *malondialdehyde*, MDA) i 4-hidroksinonenala (eng. *4-hydroxynonenal*, 4-HNE) (Thakur i sar. 2019, Li i sar. 2023), koji izazivaju oštećenje ćelijskih membrana i proteina, aktiviraju signalne puteve koji vode do ćelijske smrti i mogu doprineti pojavi anksioznosti kroz narušavanje homeostaze u CNS-u (Slika 1.3.).

CD36 receptor prepoznaje oksidovane lipide i A β , te stimuliše inflamatorne puteve preko receptora sličnih tolu (engl. *toll-like receptors*, TLR), što povećava inflamaciju i dodatno doprinosi riziku od anksioznosti (Slika 1.3.) (Li i sar. 2023). Lipokalin 2 (eng. *lipocalin 2*, LCN2), koji glijalne ćelije proizvode pod uslovima oksidativnog stresa, oštećuje krvno-moždanu barijeru, čime dalje stimuliše oštećenje endotelnih ćelija i astrocita. LCN2 takođe reguliše ćelijsku aktivnost u centralnom nervnom sistemu putem kontrole akumulacije gvožđa, proces koji može doprineti razvoju anksioznosti.

Oksidativni stres, posredovan prisustvom reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), dodatno dovodi do oksidacije lipida, posebno u okviru polinezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), a završni proizvodi lipidne peroksidacije, poput 4-HNE, izazivaju karbonilaciju proteina i citotoksične efekte (Li i sar. 2023). Ovi procesi, zajedno sa oksidativnim oštećenjima, čine osnovu za razvoj anksioznosti i kognitivnih poremećaja kod dijabetičara.



Slika. 1.3. Uloga oksidativnog stresa u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja kod dijabetes melitusa

Oksidativni stres dovodi do redukcije GLUT4 ekspresije i translokacije GLUT4 receptora sa površine membrane čime smanjuje osetljivost ćelije na insulin. U normalnim uslovima, insulin aktivira PI3K/PDK1/AKT i PI3K/AKT/mTOR signalni put koji dalje inhibira apoptozu i promovira razvoj i preživljavanje neurona, u slučaju postojanja insulinske rezistencije dolazi do inhibicije ovih puteva (Li i sar. 2023). Neuroinflamacija dovodi do aktivacije mikroglije i signalnih puteva, uključujući IL1-R1, NLRP3/IL-1β i NF-κB, što rezultira oslobađanjem proinflamatornih faktora koji dodatno podstiču neuroinflamaciju i uzrokuju oštećenja neurona u mozgu. Inhibicija TLR4/AKT/mTOR signalnog puta dovodi do inhibicije ćelijske autofagije, dalje potencirajući neuroinflamaciju i apoptozu mikroglije (Li i sar. 2023). Kognitivni poremećaji nastaju i kao posledica poremećaja metabolizma lipida u mozgu. Naime, CD36 prepoznaje oksidovane LDL receptore (TLRS) i pokreće toll-like odgovor kako bi pokrenulo proces inflamacije. LCN2 se primarno proizvodi u glijalnim ćelijama u toku stresa, promovira neuroinflamaciju putem aktivacije NF-κB i STAT3 signalnog puta čime dovodi do aktivacije mikroglije. Skraćenice: GLUT = glukozni transporter 4 (eng. glucose transporter type 4), PI3K = fosfatidilinozitol 3'-kinaza (eng. phosphatidylinositol 3-kinase), PDK1 = piruvat dehidrogenaza kinaza izoforma 1 (eng. pyruvate dehydrogenase kinase isoform 1), AKT = protein kinaza B (eng. protein kinase B), mTOR = meta rapamicina kod sisara (eng. mammalian target of rapamycin), TLR4 = receptori slični tolu 4 (eng. toll-like receptor 4), IL1-R1 = interleukin 1 receptor tip 1 (eng. interleukin 1 receptor type 1), NLRP3 = NLR porodica koja sadrži 3 purinska domena (eng. NLR family pyrin domain containing 3), NF-κB = nuklearni faktor kapa B (eng. nuclear factor kappa B), LCN2 = lipokalin 2 (eng. lipocalin 2), STAT3 = signal transdukcije i transkripcije 3 (eng. signal transducer and activator of transcription 3), CD36 = trombocitni glikoprotein 4 (eng. platelet glycoprotein 4).

Prema: Li i sar. 2023.

1.3.4. Uloga neuroinflamacije u razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja

Kao što je prethodno navedeno, oksidativni stres dovodi do razvoja neuroinflamacije, što može doprineti razvoju anksioznosti i kognitivnih poremećaja. Povećana propustljivost krvno-moždane barijere, izazvana aktivacijom signalnog puta NF- κ B, omogućava veći inluks glukoze iz krvi u CNS. Kao posledica toga, dolazi do povećane produkcije krajnjih proizvoda glikacije (engl. *advanced glycation end-products*, AGE), koji se vezuju za AGE receptore (engl. *receptors for advanced glycation end-products*, RAGE) na površini ćelija, čime se stimuliše produkcija ROS. Prisustvo ROS dalje dovodi do mitohondrijske disfunkcije, neuroinflamacije i sprečava regeneraciju neurona, što dodatno povećava rizik od pojave anksioznosti kod dijabetičara.

Mikroglialne ćelije igraju ključnu ulogu u procesu neuroinflamacije, jer su odgovorne za održavanje neuronske homeostaze, podržavaju rast neurona, formiranje sinapsi, uklanjanje ćelijskih fragmenata i eliminaciju proteinskih agregata, a sve to doprinosi neuroplastičnosti, odnosno sposobnosti mozga da se prilagođava i obnavlja. Mikroglia prepoznaje patogene, proteinske agregate i ćelijske fragmente pomoću receptora za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptors*, PRR), koji detektuju specifične molekulske obrasce povezane sa patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) i obrasce vezane za ćelijska oštećenja (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP). Kada dođe do mitohondrijske disfunkcije, oštećenje mitohondrijalne membrane uzrokuje oslobađanje DAMP-a, koji aktiviraju inflamatornu kaskadu i pospešuju razvoj neuroinflamacije. DAMP molekule prepoznaju PRR na mikrogliji, čime se aktiviraju TLR i signalni put NF- κ B. Ovi procesi dovode do oslobađanja proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-1 β i IL-6, kao i hemokina poput CCL2 (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2*, poznat i kao MCP-1) i CXCL10 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*).

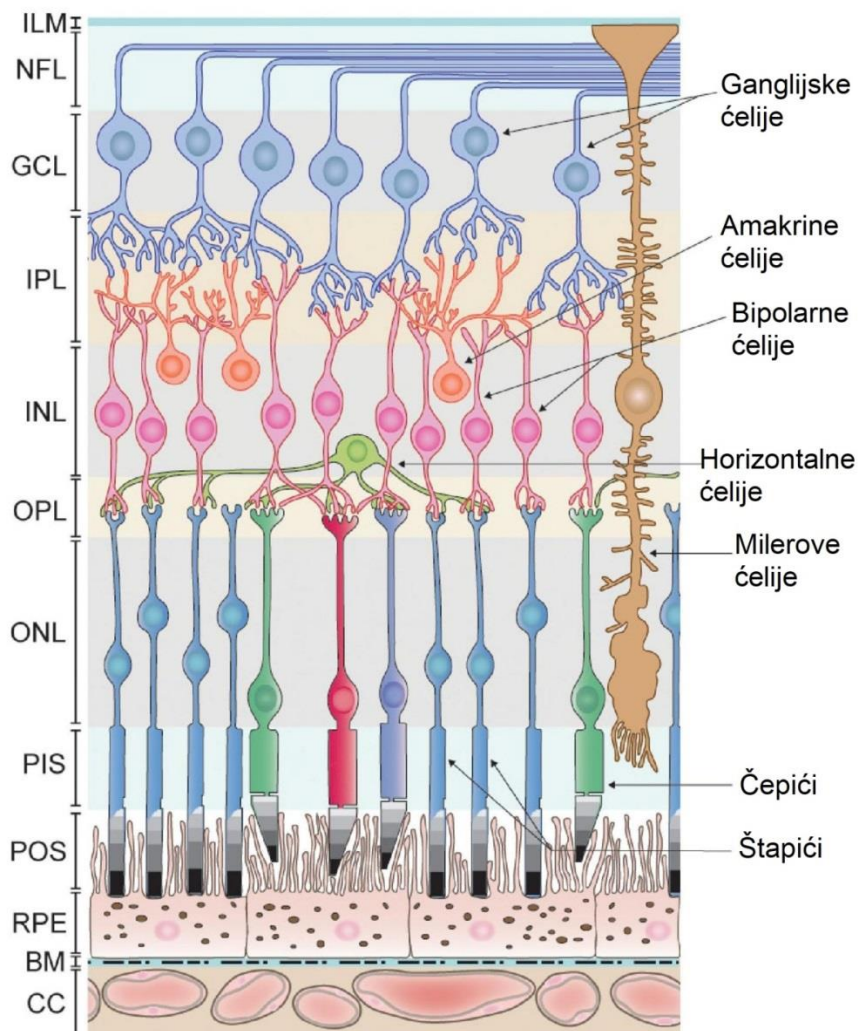
Neuroinflamacija je povezana sa hiperaktivacijom mikroglije. Preterana ekspresija dugolančane nekodirajuće RNK MEG3 (engl. *maternally expressed gene 3*, lncRNA MEG3) povezana je sa značajnim poboljšanjem kognitivne disfunkcije putem regulacije proteina Rac1 (engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i smanjenja proizvodnje ROS, kao i inhibicije apoptoze koja je povezana sa mitohondrijama. Ekspresija MEG3 ili inhibicija Rac1 proteina podstiče defosforilaciju proteina FUNDC1 (engl. *FUN14 domain containing 1*), mitohondrijskog proteina uključenog u proces mitofagije, odnosno uklanjanja oštećenih mitohondrija, što smanjuje oksidativni stres i neuroinflamaciju. Ovi procesi mogu doprineti smanjenju rizika od anksioznosti i kognitivnih oštećenja.

1.4. Anatomija retine

Tkivo retine, podeljeno je na deset slojeva koji obuhvataju sledeće: 1. unutrašnja granična membrana koja dolazi u kontakt sa vitreusom, služi kao bazalna lamina za ćelije sloja retinalnih nervnih vlakana, 2. sloj retinalnih nervnih vlakana sačinjen od aksona retinalnih ganglijskih ćelija pomešanih sa astrocitima i nastavcima Milerovih ćelija, 3. sloj ganglijskih ćelija sačinjen od tela ganglijskih ćelija čiji aksoni učestvuju u formiranju optičkog nerva, 4. unutrašnji pleksiformni sloj gde aksoni bipolarnih ćelija formiraju sinapse sa ganglijskim ćelijama, takođe dendriti amakrinih ćelija formiraju sinapse u ovoj zoni i učestvuju u modulaciji električnih signala između bipolarnih ćelija i ganglijskih ćelija, 5. unutrašnji nuklearni sloj sačinjen od tela bipolarnih, horizontalnih i amakrinih ćelija, 6. spoljašnji pleksiformni sloj u kom fotoreceptorske ćelije ostvaruju sinapse sa dendritima ćelija lokalizovanih u unutrašnjem nuklearnom sloju, 7. spoljašnji nuklearni sloj sačinjen od tela

fotoreceptora, 8. spoljašnja granična membrana, region u kom se ostvaruju veze između fotoreceptorskih i Milerovih ćelija, takođe ova membrana učestvuje u razdvajanju tela štapića i čepića od njihovih unutrašnjih i spoljašnjih segmenata, 9. sloj fotoreceptora, region sačinjen od spoljašnjih i unutrašnjih segmenata fotoreceptora, 10. retinalni pigmentni epitel (Slika 1.4.).

U pogledu vaskularizacije, spoljašnji slojevi retine (sloj fotoreceptora i retinalni pigmentni epitel) dobijaju vaskularizaciju iz horiokapilarisa dok se unutrašnji slojevi snabdevaju putem krvnih sudova porekla centralne retinalne arterije koja učestvuje u formiranju tri kapilarna pleksusa (Campbell i sar. 2017). Spoljašnji pleksus je sačinjen od arterija, arteriola, kapilara, venula i vena primarno lokalizovanih u sloju ganglijskih ćelija. Postoje dve dublje kapilarne mreže iznad i ispod unutrašnjeg nuklearnog sloja koje čine srednji ili duboki kapilarni preksus koji je vertikalnim anastomozama povezan sa spoljašnjim vaskularnim pleksusom (Campbelli sar. 2017). Poslednji je radijalni peripapilarni kapilarni pleksus koji se karakteriše paralelnom organizacijom u odnosu na aksone sloja nervnih vlakana.



Slika 1.4. Šematski prikaz građe retine

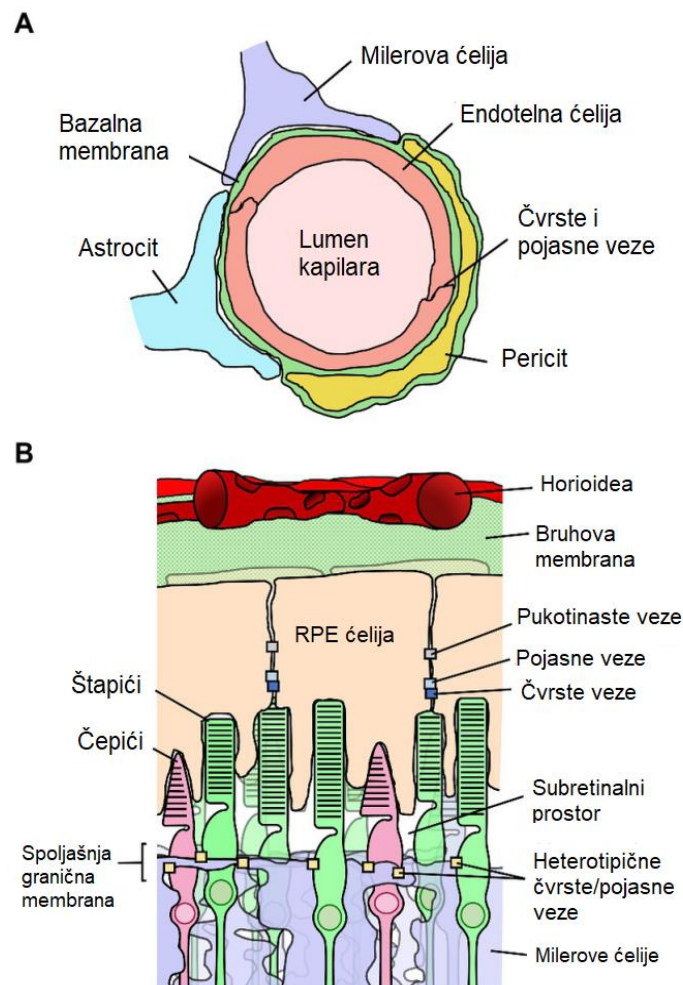
Skraćenice: ILM = unutrašnja granična membrana (eng. internal limiting membrane), NFL = sloj nervnih vlakana (eng. nerve fiber layer), GCL = sloj ganglijskih ćelija (eng. ganglion cell

layer), IPL = unutrašnji pleksiformni sloj (eng. inner plexiform layer), INL = unutrašnji nuklearni sloj (eng. inner nuclear layer), OPL = spoljašnji pleksiformni sloj (eng. outer plexiform layer), ONL = spoljašnju nuklearni sloj (eng. outer nuclear layer), PIS = unutrašnji segment fotoreceptora (eng. inner segments of rods and cones), POS = spoljašnji segment fotoreceptora (eng. outer segments of rods and cones), RPE = retinalni pigmentni epitel (eng. retinal pigment epithelium), BM = Bruhova membrana (eng. Bruch's membrane), CC = horiokapilaris (eng. choriocapillaris).

Prema: Zouache 2022.

1.4.1. Krvno-retinalna barijera

Krvno-retinalna barijera štiti unutrašnji deo oka od prodora krvi, održavajući njegovu transparentnost i funkciju (Slika 1.5.). Ova barijera je ključna za isporuku hranljivih materija i eliminaciju otpadnih proizvoda metabolizma. Retina ima dve tačke interakcije sa krvotokom: jednu na nivou retinalnih krvnih sudova i drugu na kontaktu između ćelija retinalnog pigmentnog epitela i horioideje. Krvno-retinalna barijera se sastoji od unutrašnje i spoljašnje barijere, koje su ključne za održavanje fizioloških uslova u retini i zaštitu retinalnih neurona. Ona reguliše kretanje tečnosti i sprečava prodor štetnih supstanci.



Slika 1.5. Šematski prikaz unutrašnje i spoljašnje krvno-retinalne barijere

(A) Šematski prikaz preseka retinalnog kapilara sa tipom veza između endotelnih ćelija koje učestvuju u formiranju unutrašnje krvno-retinalne barijere i tipovima ćelija koje okružuju krvne sudove.
(B) Šematski prikaz veza između ćelija retinalnog pigmentnog epitela koje formiraju spoljašnju krvno-retinalnu barijeru zajedno sa pridruženim strukturama.

Prema: Haydinger i sar. 2023.

1.4.1.1. Unutrašnja krvno-retinalna barijera

Unutrašnju krvno-retinalnu barijeru čine endotelne ćelije, astrociti, Milerove ćelije i periciti. Endotelne ćelije imaju čvrste spojeve koji formiraju osnovu barijere. Ove ćelije nisu fenestrirane, što doprinosi njihovoj niskoj propustljivosti. Periciti, koji se nalaze iznad endotelnih ćelija, imaju ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa i sintezi proteina koji održavaju integritet barijere. Milerove ćelije i astrociti obezbeđuju nutritivnu podršku neuronima. Milerove ćelije skladište glikogen, regulišu jonsku koncentraciju i učestvuju u glutamat/glutamin ciklusu, dok astrociti održavaju integritet krvno-retinalne barijere kroz povećanje ekspresije ZO-1 (eng. *zonula occludens 1*) proteina.

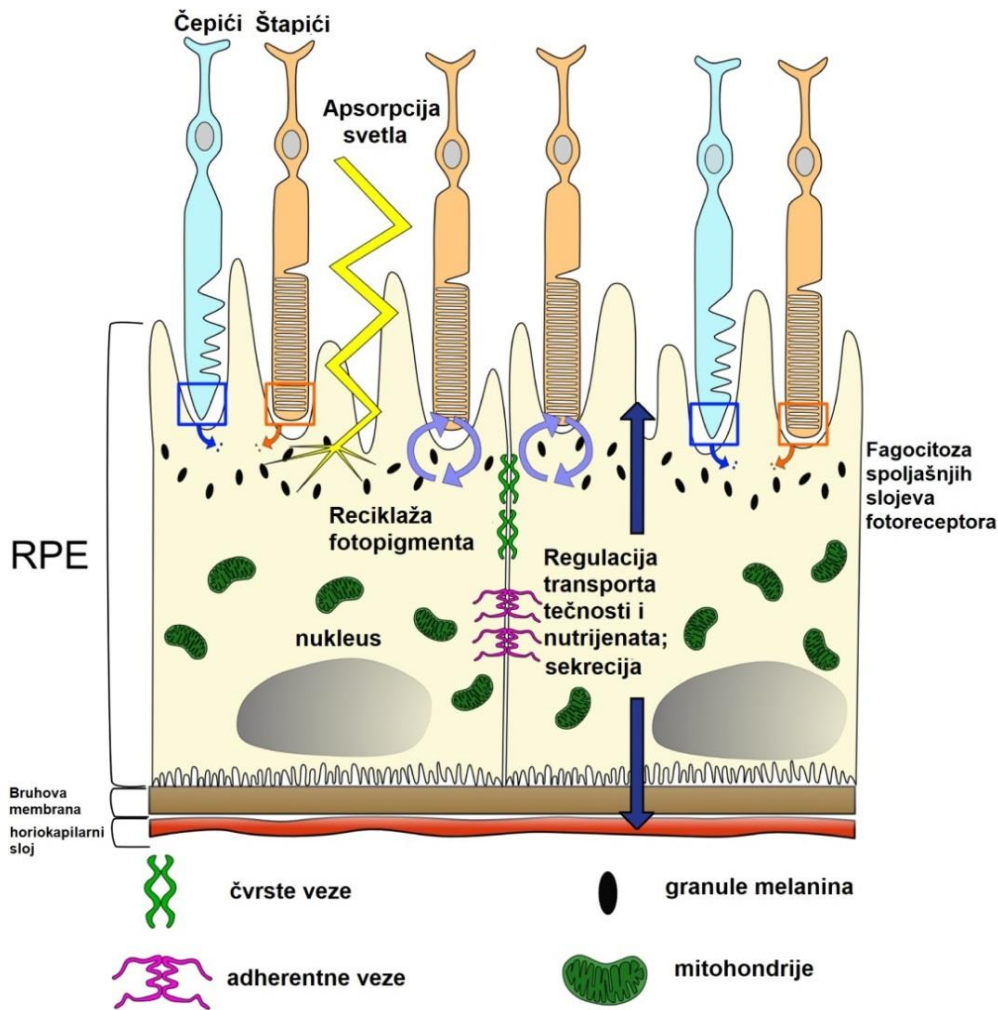
1.4.1.2. Spoljašnja krvno-retinalna barijera

Spoljašnja krvno-retinalna barijera se formira između susednih ćelija retinalnog pigmentnog epitela. Ove ćelije omogućavaju selektivni transport metabolita i kiseonika, apsorbuju svetlost i luče trofičke faktore. Kretanje jona natrijuma, kalijuma i vode kroz retinalni pigmentni epitel regulisano je proteinskim pumpama i kanalima kao što su Na⁺/K⁺-ATP-aza i akvaporin 1. Čvrsti spojevi između epitelnih ćelija retinalnog pigmentnog epitela regulišu paracelularno kretanje tečnosti. Spoljašnji retinalni slojevi dobijaju hranljive materije kroz fenestrirane kapilare horiokapilarisa, dok se otpadni produkti metabolizma transportuju do horioideje.

U oba tipa krvno-retinalne barijere, proteini koji formiraju čvrste spojeve ograničavaju kretanje tečnosti i molekula između krvi i retine, održavajući stabilnost unutar retine.

1.4.2. Retinalni pigmentni epitel

Retinalni pigmentni epitel (RPE) predstavlja sloj ćelija lokalizovan između retine i horioideje. RPE je glavni tvorac krvno-retinalne barijere zahvaljujući čvrstim vezama (eng. *tight junction*) koje postoje između ćelija RPE sloja (George i sar. 2021). Svojom apikalnom stranom, RPE ćelije komuniciraju sa spoljašnjim segmentima fotoreceptora i imaju ključnu ulogu u njihovom održavanju (Slika 1.6.). Transport kiseonika, nutrijenata i jona iz horioideje u retinu odigrava se preko ovog sloja. RPE ima funkciju razgradnje i recikliranja komponenti vizuelne kaskade čime učestvuje u održavanju vizuelnog ciklusa (George i sar. 2021). Bolesti retine koje primarno zahvataju ovaj sloj obuhvataju senilnu degeneraciju makule, Stargardtovu bolest i neke forme retinitis pigmentoze.



Slika 1.6. Šematski prikaz RPE sloja i njegovih interakcija sa slojem fotoreceptora. Prema: George i sar. 2021.

1.4.3. Sloj fotoreceptora

Štapići i čepići predstavljaju specijalizovane nervne ćelije osetljive na svetlost koje su lokalizovane ispred RPE sloja. Štapići su ćelije koje primarno funkcionišu u uslovima prigušenog svetla, dok čepići reaguju na dnevnu svetlost i jako osvetljenje. Retina je sačinjena od oko 120 miliona štapića i 6 miliona čepića, koji su lokalizovani u predelu makularne regije (Molday i Moritz 2015). Štapići i čepići se sastoje od pet glavnih delova: spoljašnjeg segmenta, vezujućih cilija, unutrašnjeg segmenta, nuklearnog regiona i sinaptičkog regiona. Spoljašnji segment učestvuje u konverziji svetlosti u električne signale procesom fototransdukcije. Vezujuće cilije povezuju spoljašnji i unutrašnji segment i omogućavaju transport specifičnih proteina u spoljašnji segment. Unutrašnji segment sadrži mitohondrije, endoplazmatski retikulum, Golgi kompleks, lizosome i ostale ćelijske organele te predstavlja centar metaboličke i biosintetske aktivnosti. Sinaptički region sadrži vezikule kojima se neurotransmiter glutamat transportuje do bipolarnih ćelija i ostalih sekundarnih neurona u retini (Molday i Moritz 2015).

1.4.4. Milerove ćelije

Postoje tri glavna tipa glijalnih ćelija u tkivu retine, a to su Milerove ćelije, astrogljalne i mikrogljalne ćelije. Telo Milerovih ćelija lokalizovano je u unutrašnjem nuklearnom sloju, dok svoje kraće i duže nastavke pružaju sve do unutrašnje i spoljašnje granične membrane. Milerove ćelije i astroglija pokazuju sličnosti sa glijalnim ćelijama lokalizovanim u drugim delovima centralnog nervnog sistema. Za razliku od Milerovih ćelija koje se pružaju duž više slojeva retine, astroglija je lokalizovana isključivo u sloju nervnih vlakana. Astrociti imaju važnu ulogu u produkciji vaskularnog endotelnog faktora rasta čime stimulišu razvoj retinalne vaskularne mreže. Nakon retinalne traume, Milerove ćelije učestvuju u procesu koji se naziva reaktivna glijoza a obuhvata promene kako na molekularnom i biohemijskom, tako i na morfološkom nivou (Nakazawa i sar. 2007). Anatomske, ovaj proces obuhvata povećanje zapremine Milerovih ćelija kao i njihov rast van neuralne retine što dovodi do stvaranja ožiljaka koji formiraju fizičku barijeru između RPE sloja i sloja fotoreceptora. Reaktivna glijoza je praćena povećanom ekspresijom vimentina i glijalnog fibrliranog kiselog proteina (GFAP) u Milerovim ćelijama (Nakazawa i sar. 2007).

1.5. Dijabetička retinopatija

Dijabetička retinopatija (DR) je komplikacija dijabetesa koja pogađa krvne sudove retine i predstavlja vodeći uzrok slepila među odraslima u radno aktivnom dobu (Tan i sar. 2023). DR se razvija kada povišeni nivoi glukoze u krvi oštećuju mikrovaskularne strukture retine. Oštećeni krvni sudovi se karakterišu povećanom propustljivošću što dovodi do razvoja retinalnog edema. U težim slučajevima, novoformirani abnormalni krvni sudovi mogu rasti po površini retine, što može dovesti do krvarenja i stvaranja fibrovaskularnih proliferativnih traka koje mogu rezultirati razvojem tracione ablacije, krvarenjem u predelu staklastog tela i potpunim gubitkom vida (Lin i sar. 2021).

Postoje dve glavne forme dijabetičke retinopatije: neproliferativna dijabetička retinopatija (NPDR) i proliferativna dijabetička retinopatija (PDR). U ranim fazama NPDR se karakteriše pojavom manjih tačkastih i/ili mrljastih krvarenja i razvojem mikroaneurizmi (mala ispučenja na zidovima krvnih sudova), obično bez simptoma, ali mogu napredovati u ozbiljnije oblike (Tan i sar. 2023). Simptomi DR-a uključuju zamagljen vid, plutajuće tačkice ili mrlje u vidnom polju, oštećenje vida noću ili potpuni gubitak vida.

Lečenje zavisi od faze u kojoj se bolest nalazi i uključuje kontrolu glukoze u krvi, lasersku terapiju za obliteraciju abnormalnih krvnih sudova i sprečavanje rasta novih, intravitrealnu primenu lekova kao što su anti-VEGF ili kortikosteroidi za smanjenje curenja i oticanja iz krvnih sudova, i vitrektomiju, hirurški zahvat kojim se uklanjaju krv iz staklastog tela i/ili fibrovaskularna proliferacija sa površine retine kako bi se smanjila trakcija i poboljšao vid (Lin i sar. 2021).

Tabela 1.1. Klasifikacija stadijuma dijabetičke retinopatije po studiji ranog tretmana dijabetičke retinopatije (eng. *early treatment diabetic retinopathy study, ETDRS*)

Stadijum bolesti	Nalaz na očnom dnu
Neproliferativna dijabetička retinopatija (NPDR)	
Bez prisutne retinopatije	Bez vidljivih promena
Veoma početna forma NPDR	Mikroaneurizme

Početna forma NPDR	Mikroaneurizme, retinalne hemoragije, tvrdi eksudati, cotton-wool plaže, bez prisutnih intraretinalnih mikrovaskularnih abnormalnosti (IRMA)
Umerena forma NPDR	Izraženije retinalne hemoragije u jednom do tri kvadranta ili umerena IRMA Promene na venskim krvnim sudovima u jednom kvadrantu Cotton-wool plaže
Izražena forma NPDR	Pravilo 4-2-1, jedan ili više od navedenog: Izražene hemoragije u sva četiri kvadranta, Promene na venskim krvnim sudovima u dva ili više kvadranta, Umerena IRMA u jednom ili više kvadranta.
Proliferativna dijabetička retinopatija (PDR)	
Blaga do umerena forma	Neovaskularizacija optičkog diska ili periferije
Visoko-rizična forma	Izražena neovaskularizacija, vitrealne/ preretinalnehemoragije

1.5.1. Poremećaj metabolizma glukoze i razvoj dijabetičke retinopatije

Glukoza se koristi za dobijanje energije u procesima glikolize, Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije. Poremećaji metabolizma glukoze povezani su sa neurološkim i mikrovaskularnim komplikacijama dijabetes melitusa. Glikolitički put, kao najrasprostranjeniji metabolički put u živim organizmima, podeljen je u dve faze i to: pripremnu fazu i fazu iskorišćavanja. Tokom pripreme faze, glukoza se kroz pet reakcija konvertuje u gliceraldehid-3-fosfat (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate*, G3P), pri čemu se troše dva molekula ATP-a (Liu i sar. 2023). U fazi iskorišćavanja G3P se kroz pet reakcija konvertuje u piruvat, pri čemu se proizvode četiri molekula ATP-a.

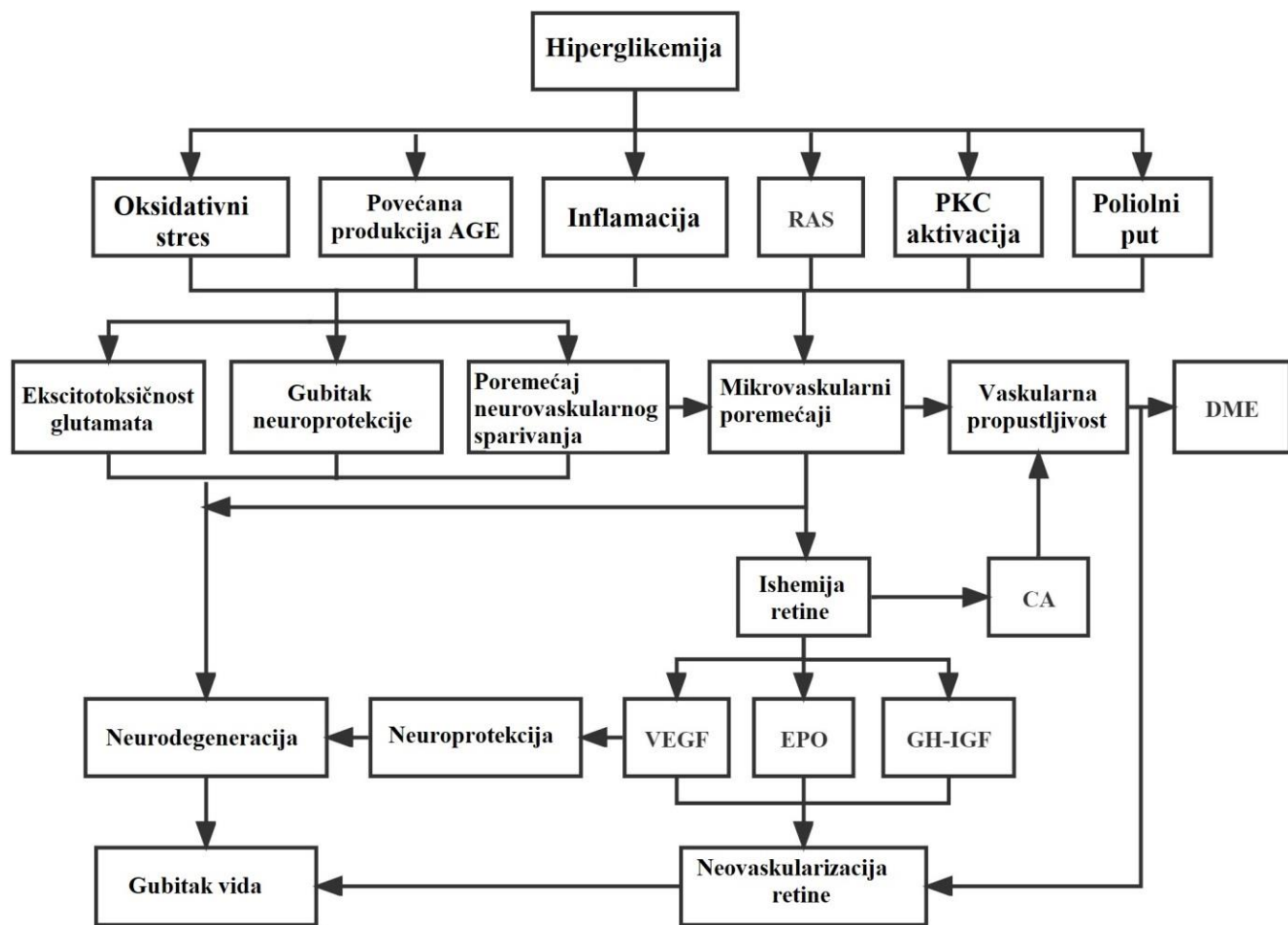
Sva tkiva održavaju stabilne koncentracije intermedijernih proizvoda kroz regulaciju glikolize. Međutim, u uslovima hiperglikemije, glikolitička aktivnost se povećava, proizvodeći veliki priliv intermedijera i njihovo preusmeravanje u alternativne metaboličke puteve, što dovodi do razvoja DR-a. Hiperglikemija pokreće čitavu kaskadu fizioloških i biohemijskih promena čime dovodi do mikrovaskularnih promena, ishemije retine i pratećih komplikacija. Povećana produkcija vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) uključena je u patogenezu DR-a i vaskularnih komplikacija kao što su neovaskularizacija i edem u predelu makule.

Hiperglikemija dovodi do pojačane inflamacije, povećanja oksidativnog stresa, povećane aktivacije RAGE, aktivacije renin-angiotenzin sistema (RAS) i disfunkcije endotelnih progenitorskih ćelija. Hiperglikemija oštećuje retinu aktivacijom poliolskog i heksozaminskog puta, aktivacijom izoformi protein kinaze C (PKC) i povećanim stvaranjem AGE (Slika 1.7.) (Liu i sar. 2023). Hronična hiperglikemija dovodi do retinalne neurodegeneracije, mikrovaskularnih promena i poremećaja neurovaskularne jedinice. Takođe, eritropoetin, faktor rasta, insulinu sličan faktor rasta i angiopoetin učestvuju u razvoju DR-a. Eritropoetin i njegovi receptori sintetišu se u okviru RPE-a i imaju važnu ulogu u privlačenju retinalnih progenitorskih ćelija na mesta oštećenja. U uslovima kada dolazi do pojačane ekspresije eritropoetina u ishemijom zahvaćenom tkivu retine dolazi do razvoja neovaskularizacije i progresije PDR-a. Hormon rasta i insulinu sličan faktor rasta imaju važnu ulogu u razvoju neovaskularizacije (Liu i sar. 2023). Hormon rasta direktno stimuliše proliferaciju humanih retinalnih endotelnih ćelija.

Insulinu sličan faktor rasta eksprimiran je u okviru krvnih sudova, neurona i glijalnih ćelija retine.

Sa druge strane, angiopoetinski put već je testiran u cilju primene potencijalnih terapijskih sredstava. Faricimab predstavlja bisferično antitelo koje dovodi do dvostruke inhibicije VEGF-A i angiopoetina-2 čime dovodi do pojačane vaskularne stabilnosti (Liu i sar. 2023). Takođe, proteomičke analize pokazale su povišene ekstracelularne vrednosti karbonske anhidraze u sklopu DR-a što dovodi do povećane propustljivosti krvnih sudova i posledičnog razvoja edema u predelu makule.

Dva ključna faktora uključena u proces neurodegeneracije su akumulacija ekstracelularnog glutamata i poremećaj produkcije netinalnih neuroprotektivnih faktora kao što su intersticijalni retinol vezujući protein, somatostatin, neurotrofini i faktor porekla pigmentnog epitela.



Slika 1.7. Patofiziološki aspekti razvoja dijabetičke retinopatije

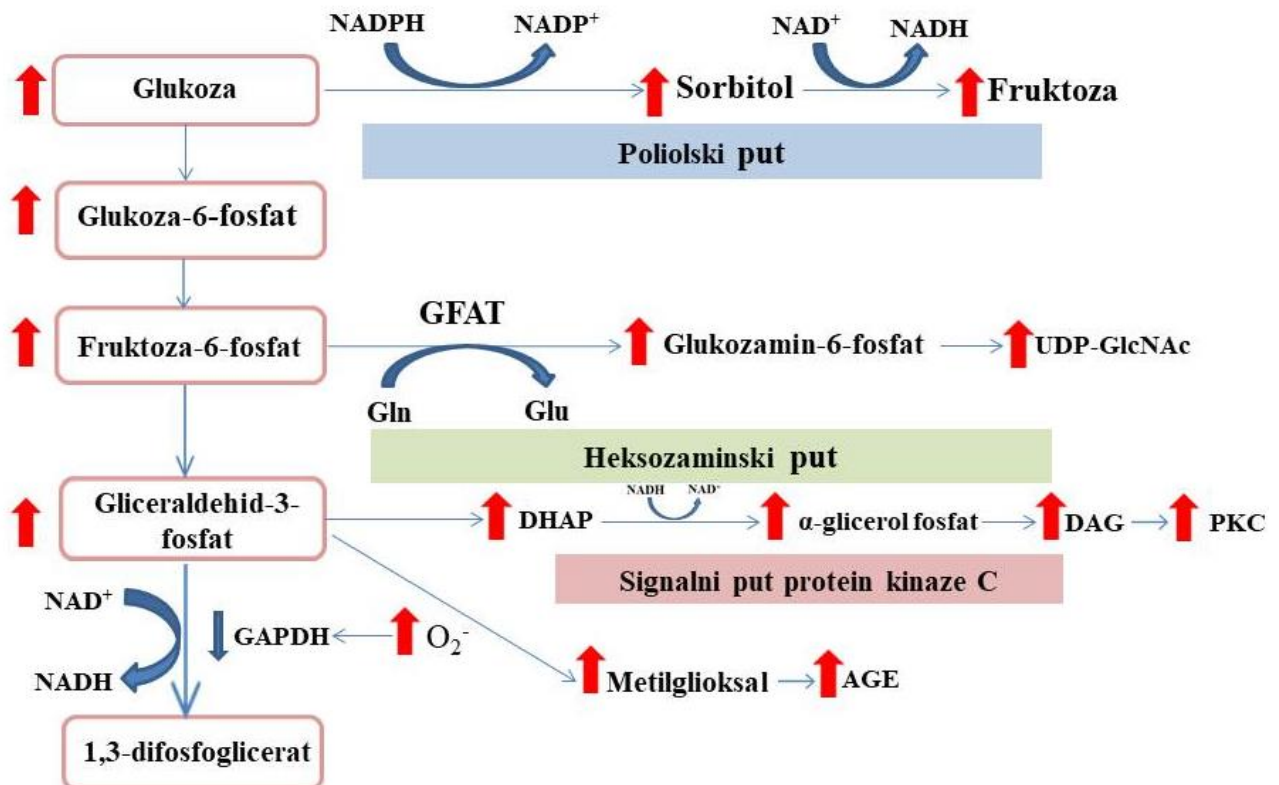
Hiperglikemija dovodi do neurodegeneracije i mikrovaskularnih promena čime dovodi do razvoja dijabetičke retinopatije. Neurodegeneracije može biti posredovana toksičnim efektima glutamata, gubitkom neuroprotekcije i poremećajem neurovaskularnog povezivanja. U međuvremenu, poremećaj neurovaskularnog povezivanja dovodi do mikrovaskularnih poremećaja koji pokreću nastanak DME i retinalne neovaskularizacije. Skraćenice: AGE = napredni krajnji produkti glikacije (eng. advanced glycation end-products), RAS = renin-angiotenzin sistem, PKC = protein kinaza C, DME = dijabetički edem u makuli, CA = karbon anhidraza (eng. carbonic anhydrase), VEGF = vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor), EPO = eritropoetin, GH-IGF = sistem hormon rasta-faktor rasta sličan insulinu (eng. growth hormone-insulin-like growth factor system).

1.5.2. Alternativni metabolički putevi u uslovima hiperglikemije

Hiperglikemija uzrokuje povećanje nivoa glukoze u ćelijama, što vodi do pojačanog metabolizma i većeg stvaranja redukovanog oblika nikotinamid adenin dinukleotida (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)*, NADH). Kao rezultat toga, odnos NADH i nikotinamid adenin dinukleotida (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NAD) u ćeliji raste, a ćelija nastoji da prenese višak elektrona sa NADH na kiseonik kako bi obnovila rezerve NAD-a. Međutim, zbog prevelikog fluksa elektrona, dolazi do inhibicije kompleksa III respiratornog lanca. Elektroni se sada prenose direktno sa koenzima Q na kiseonik, što dovodi do stvaranja superoksidnog anjona i, samim tim, oksidativnog stresa (Yumnamcha i sar. 2020).

Povišeni nivoi glukoze u ćeliji tako rezultiraju oksidativnim stresom koji oštećuje mitohondrijsku DNK, koja je posebno osetljiva. Kako bi se popravila oštećenja, aktivira se poli (ADP-ribozo) polimeraza (eng. *poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP), koja koristi NAD kao koenzim, što troši njegove rezerve. NAD je potreban i enzimu gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazi (eng. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) u glikolizi, pa njegov nedostatak inhibira ovaj enzim i dovodi do poremećaja u glikolizi. G3P se nakuplja i ne može se pretvoriti u sledeći intermedijer, što dovodi do taloženja prekursora pre ove tačke u procesu glikolize (Yumnamcha i sar. 2020).

Ovi prekursori ulaze u alternativne metaboličke puteve: glukoza prelazi u poliolski put, fruktozo-6-fosfat u heksozaminski put, dok G3P i dihidroksiaceton-fosfat formiraju diacilglicerol, koji aktivira protein kinazu C (Slika 1.8.) (Yumnamcha i sar. 2020). Osim toga, G3P doprinosi stvaranju AGE, što dodatno doprinosi patološkim procesima.



Slika 1.8. Alternativni metabolički putevi u uslovima hiperglikemije: poliolski put, heksozaminski put i signalni put protein kinase C

Skraćenice: NADP = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), NADPH = redukovani oblik NADP (engl. reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), NAD⁺ = oksidovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (engl. oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide), NADH = redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (engl. reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide), GAPDH = gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), Gln = glutamin (engl. glutamine), Glu = glutamat (engl. glutamate), UDP-GlcNAc = uridin-difosfo-N-acetilglukozamin (engl. uridine diphosphate N-acetylglucosamine), DHAP = dihidroxiaceton-fosfat (engl. dihydroxyacetone phosphate), DAG = diacilglicerol, PKC = protein kinaza C, AGE = napredni krajnji produkti glikacije (engl. advanced glycation end-products).

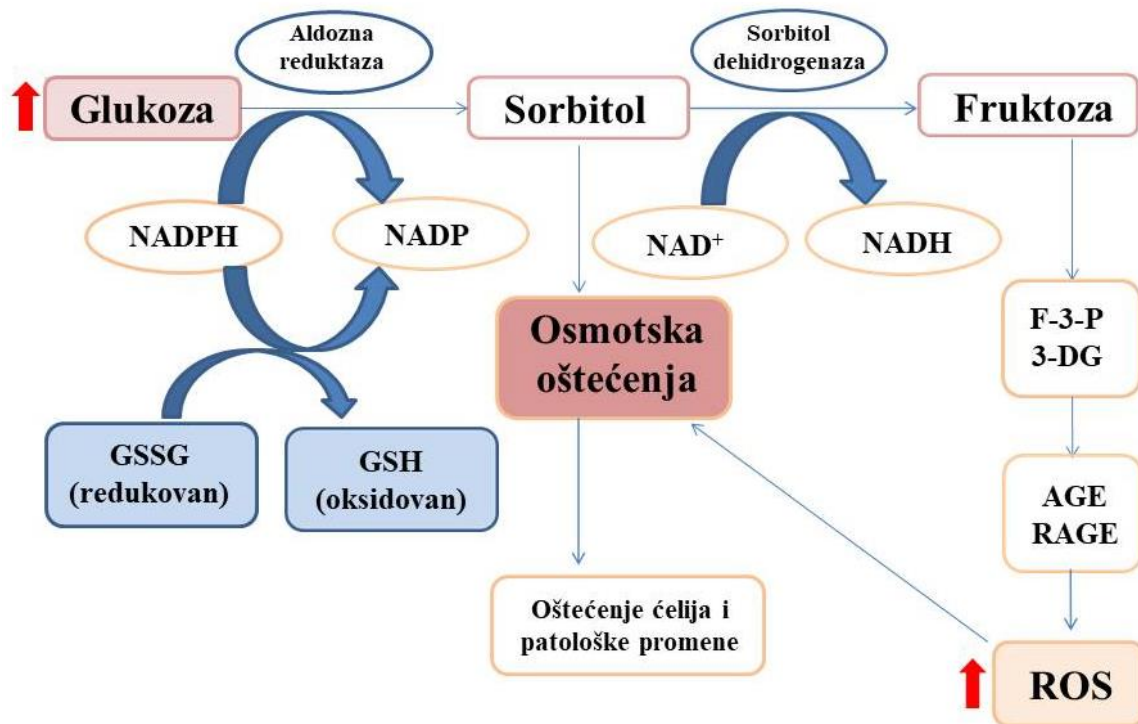
Prema: Rahangdale i sar. 2009.

1.5.2.1. Poliolski put

U uslovima hiperglikemije, višak glukoze koji se zadržava u ćeliji metaboliše se do fruktoze kroz dve ključne reakcije u okviru poliolskog puta. Pod dejstvom enzima aldozne reduktaze, glukoza se prvo konvertuje u sorbitol. Zbog niske propustljivosti ćelijske membrane za sorbitol, on se zadržava u ćelijama, što dovodi do osmotskog bubrenja ćelija.

U sledećem koraku, sorbitol se delovanjem sorbitol dehidrogenaze prevodi u fruktozu. Aldoza reduktaza koristi NADPH kao donora elektrona za redukciju glukoze, pri čemu se NADPH konvertuje u NADP⁺. Time opada koncentracija NADPH u ćelijama, što je posebno štetno jer je NADPH neophodan za regeneraciju redukovanog glutationa, važnog ćelijskog antioksidansa (Yumnamcha i sar. 2020). Smanjenje nivoa glutationa povećava osetljivost ćelija na oksidativni stres. Sorbitol dehidrogenaza, koja katalizuje prevođenje sorbitola u fruktozu, koristi NAD kao koenzim, pri čemu se NAD redukuje u NADH. Ovo dovodi do povećanja odnosa NADH/NAD u ćeliji, što može stimulisati stvaranje slobodnih radikala i dodatno pojačati oksidativni stres (Slika 1.9.).

Nastala fruktoza dalje se metaboliše do fruktoze-3-fosfata, koja se može transformisati u 3-deoksi-glukozon (3-DG), veoma reaktivno dikarbonilno jedinjenje. Ova supstanca predstavlja prekursor za formiranje AGE. AGE produkti imaju visok afinitet za proteine, s kojima formiraju adukte ili prouzrokuju unakrsno vezivanje proteina, čime doprinose ćelijskom oštećenju i razvoju komplikacija, naročito u dijabetičkim stanjima (Yumnamcha i sar. 2020).



Slika 1.9. Poliolski put

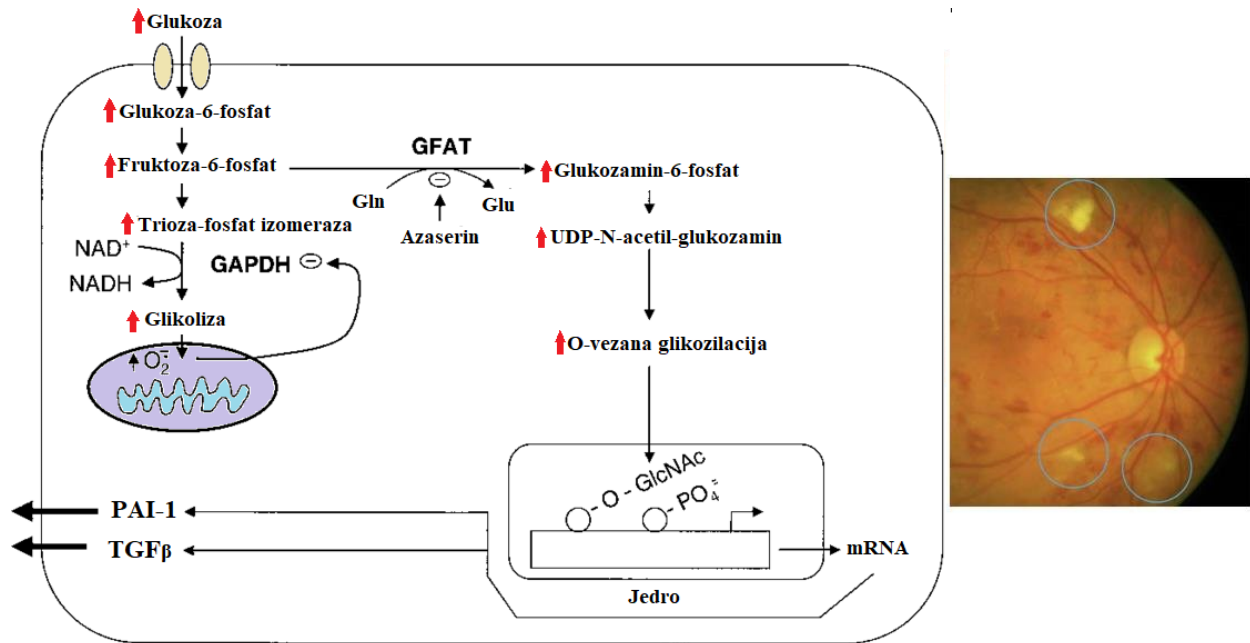
Poliolski put se sastoji od dva ključna enzima: aldozne reduktaze i sorbitol dehidrogenaze. U uslovima hiperglikemije, aldozna reduktaza redukuje glukozu u sorbitol. Sorbitol dehidrogenaza zatim oksidiše sorbitol u fruktozu. Sorbitol dovodi do osmotskog oštećenja ćelije. Skraćenice: NADP = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), NADPH = redukovani oblik NADP; NAD⁺ = oksidovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (engl. oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide), NADH = redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (engl. reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide), GSSG = glutation disulfid (engl. glutathione disulfide), GSH = glutation (engl. glutathione), AGE = napredni krajnji produkti glikacije (engl. advanced glycation end-products), RAGE = receptori za AGE, ROS = reaktivne kiseonične vrste (engl. reactive oxygen species), 3-DG = 3-deoksi-D-glukoza (engl. 3-deoxy-D-glucose), F-3-P = fruktoza-3-fosfat (engl. fructose-3-phosphate).

Prema: Pradeep i Srinivasan 2018.

1.5.2.2. Heksozaminski put

Heksozaminski put započinje ulaskom fruktozo-6-fosfata (engl. fructose-6-phosphate, F6P), jednog od intermedijernih produkata glikolize, koji pod dejstvom enzima glutamin-fruktozo-6-fosfat aminotransferaze (engl. glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase, GFAT) prelazi u glukozamin-6-fosfat (engl. glucosamine-6-phosphate, GlcN-6P). Glukozamin-6-fosfat se zatim acetiluje, čime nastaje N-acetil glukozamin-6-fosfat (engl. N-acetylglucosamine-6-phosphate, GlcNAc-6P), koji se dalje konvertuje u N-acetil glukozamin-1-fosfat (engl. N-acetylglucosamine-1-phosphate, GlcNAc-1P), a potom u UDP-N-acetil glukozamin (engl. UDP-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc), ključni supstrat za glikozilaciju proteina.

Prekomerna glikozilacija proteina, uključujući transkripcijski faktor SF1 (engl. *splicing factor 1*), uzrokuje indukciju sinteze TGF- β , faktora koji pospešuje fibrogenezu i doprinosi fibrozi u retini. Pored toga, SF1 takođe podstiče sintezu PAI-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor 1*), koji inhibira fibrinolitički sistem i time pogoduje formiranju mikrotromboza. Ove mikrotromboze dovode do ishemije retine, koja rezultira stvaranjem "cotton wool" plaža (Slika 1.10.) (Gurel i sar. 2018, Liu i sar. 2023).



Slika 1.10. Heksozaminski put sa promenama po tipu "cotton wool" plaža

Skraćenice: PAI-1 = inhibitor aktivatora plazminogena 1 (engl. plasminogen activator inhibitor 1), TGF- β = transformišući faktor rasta beta (engl. transforming growth factor beta), GFAT = glutamin-fruktozo-6-fosfat aminotransferaza (engl. glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase), GAPDH = gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), O-GlcNAc = O-vezani N-acetilglukozamin (engl. O-linked N-acetylglucosamine), PO_4^{3-} = fosfatni jon (engl. phosphate ion).

Prema: Du i sar. 2000.

1.5.2.3. Signalni put protein kinaze C

Dihidroksiaceton-fosfat (engl. *dihydroxyacetone phosphate*, DHAP) se konvertuje u glicerol-3-fosfat (engl. *glycerol-3-phosphate*, G3P), koji zatim vezuje dve masne kiseline, formirajući diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*, DAG). DAG aktivira protein-kinazu C (engl. *protein kinase C*, PKC), čija aktivacija dovodi do povećane sinteze VEGF-a, koji je odgovoran za angiogenezu (stvaranje novih krvnih sudova) (Liu i sar. 2023). Aktivacija PKC takođe inhibira endotelnu azot-monoksid sintazu (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS), čime se smanjuje produkcija azot-monoksida (engl. *nitric oxide*, NO), važnog vazodilatatora (Liu i sar. 2023). Istovremeno, dolazi do povećane ekspresije endotelina-1 (engl. *endothelin-1*, ET-1), koji ima snažno vazokonstriktorno dejstvo. Aktivacija PKC takođe izaziva ekspresiju adhezivnih molekula na endotelu i stimuliše sekreciju TGF- β čime dodatno pospešuje zapaljenje i fibrogenezu (Liu i sar. 2023).

1.5.2.4. Uloga AGE u razvoju dijabetičke retinopatije

AGE nastaju kroz nekoliko različitih procesa. Prvi korak uključuje vezivanje glukoze za proteine, čime započinje niz reakcija u kojima se prvo formiraju Šifove baze, zatim prelaze u Amadorijeve produkte, a potom u AGE. Osim toga, neregulirana glikoliza dovodi do nakupljanja G3P, koji može preći u metilgliksal – reaktivno dikarbonilno jedinjenje koje takođe pospešuje formiranje AGE (Yumnamcha i sar. 2020). Nakupljanje fruktoze i 3-DG dodatno doprinosi reakcijama sa proteinima, što rezultira stvaranjem AGE. Na kraju, lipidna peroksidacija predstavlja još jedan put koji vodi do formiranja AGE, čime se dodatno pospešuje oksidativni stres i oštećenje ćelijskih struktura.

AGE izazivaju strukturne i funkcionalne promene na makromolekulima, uključujući proteine, nukleinske kiseline i lipide, što dovodi do oštećenja ćelija. Njihovo dejstvo ostvaruje se aktivacijom RAGE, koji pokreću prooksidativne i proinflamatorne signale. Aktivacija RAGE indukuje se sinteza proinflamatornih citokina kao što su IL-1, TNF- α i IL-6, što dalje pospešuje inflamatorni odgovor. AGE takođe utiču na antioksidativne enzime, poput SOD, smanjujući njihovu funkciju i doprinoseći oksidativnom stresu. To vodi do enzimske disfunkcije i može izazvati ćelijsku smrt (Yumnamcha i sar. 2020). Na endotelnim ćelijama AGE ispoljavaju prokoagulantna dejstva, povećavajući propustljivost endotela i izazivajući njegovu disfunkciju. Ovo može dovesti do zadebljanja kapilara u mrežnjači, povećane propustljivosti kapilara i stvaranja eksudata, što su karakteristike mikrovaskularnih oštećenja, poput onih koja se javljaju kod dijabetičke retinopatije. AGE aktiviraju NF- κ B, ključni transkripcioni faktor koji reguliše inflamatorne odgovore, dodatno pogoršavajući proinflamatorne i prooksidativne procese.

1.5.3. Poremećaj metabolizma lipida u sklopu dijabetičke retinopatije

Povećana propustljivost krvno-retinalne barijere u sklopu dijabetesa dovodi do povećanog influksa lipoproteina čime se povećava količina holesterola u retini. U normalnim uslovima, holesterol se dobija procesom lokalne biosinteze ili putem lipoproteinskih partikula koje u retinu ulaze iz horoidalne cirkulacije putem spoljašnje krvno-retinalne barijere (Busik 2021). Nakon preuzimanja od strane RPE ćelija putem ATP vezujućeg kasetnog transportera (eng. *ATP-binding cassette transporter A1*, ABCA1) i transportera člana 1 podfamilije G kasete koja vezuje ATP (eng. *ATP-binding cassette transporter G1*, ABCG1), holesterol se dalje transportuje ka neuralnoj retini ili vraća nazad u horoidalnu cirkulaciju. Ćelije RPE-a i neuralne retine metabolišu holesterol do formi oksisterola koji mogu da prođu kroz ćelijsku membranu putem citohroma P450, 27A1 i 46A1 (Busik 2021). Oksisteroli predstavljaju aktivacione ligande za X receptore jetre (eng. *liver X receptor*, LXR). Aktivacijom LXR aktiviraju se geni odgovorni za reverzni transport holesterola, dok se ekspresija inflamatornih gena putem NF- κ B suprimira. Pored aktivacije putem oksisterola, LXR aktivnost je kontrolisana i acetilacionim statusom (Busik 2021). Deacetilacija LXR povećava njenu aktivnost i posredovana je deacetilazom koja se aktivira u uslovima ćelijskog gladovanja, sirtuinom 1 (SIRT1) i povećanom aktivnošću LXR. Dijabetesom posredovan poremećaj SIRT1-LXR ose i redukovana produkcija oksisterola gubitkom citohroma P450, 27A1, i 46A1 u retini dovodi do neadekvatne vaskularne reparacije i aktivacije makrofaga/mikroglije (Busik 2021). Aktivacija LXR dovodi do uspostavljanja normalnog holesterolskog transporta, prevenira se razvoj inflamacije i nastanak dijabetesom indukovanih acelularnih kapilara. SIRT1 stimulacija putem SIRT1720 dovodi do deacetilacije LXR koja je praćena povećanjem ekspresije ABCA1 i ABCG1 mRNA. Pokazano je da aktivacija SIRT1 *in vivo* prevenira dijabetesom indukovanu inflamaciju, vaskularnu i neuralnu degeneraciju (Busik 2021).

Dakle, poremećaj homeostaze holesterola sa nespecifičnim ulaskom holesterola iz horoidalne cirkulacije putem poremećene krvno-retinalne barijere, smanjenje holesterolskog eksporta i produkcije solubilnih oksisterola u RPE-u i neuralnoj retini, dovode do povećanja koncentracije holesterola u retini i time doprinose razvoju retinopatije kod dijabetičara.

1.6. Vizuelni ciklus

Vizuelni ciklus počinje konverzijom jednog fotona svetlosne energije u električni signal u retini. Signalna transdukcija se dešava zahvaljujući receptoru vezanom za G protein (eng. *G-protein coupled receptor*, GPCR) koji se zove opsin, za koji je vezan hromofor *11-cis-retinal* (Tsin i sar. 2018). Kada se aktivira dejstvom fotona, *11-cis-retinal* podleže fotoizomerizaciji u *all-trans-retinal*, što dovodi do promene konformacije opsina i signalne transdukcione kaskade kojom se zatvara katjonski kanal kontrolisan cikličnim gvanozin monofosfatom (eng. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) i rezultira hiperpolarizacijom fotoreceptorske ćelije (Tsin i sar. 2018). Promena potencijala čepića i štapića pokreće nervni impuls koji naš mozak percipira kao vid. Nakon izomerizacije i oslobađanja opsina, *all-trans-retinal* se redukuje u *all-trans-retinol*, a zatim transportuje u RPE sloj. Tu se esterifikuje lecitin-retinol aciltransferazom (LRAT) do retinil estera, konvertuje u *11-cis-retinol* izomerohidrolazom RPE65, a zatim oksiduje u *11-cis-retinal* pre nego se vrati fotoreceptorima kako bi sa opsinom formirao rodopsin (Tsin i sar. 2018).

Glavne komponente vizuelnog ciklusa koje se eksprimiraju na nivou RPE sloja jesu tri enzima (RPE65, LRAT i retinol dehidrogenaza 5, RDH5), dva nosioca retinoidnih proteina (eng. *retinaldehyde-binding protein 1*, RLBP1 i eng. *retinol-binding protein 1*, RBP1) i modulator (eng. *retinal G protein-coupled receptor*, RGR) čija je uloga da kontinuirano dostavlja *11-cis* retinal retinalnim fotoreceptorima (Masuda i sar. 2014).

Protein retinalnog pigmentnog epitela 65 kDa (RPE65) predstavlja jednu od ključnih komponenti u sklopu vizuelnog ciklusa. RPE65 koristi *all-trans* retinil estere kao supstrat koji konvertuje putem hidrolize i alkenske izomerizacije u *11-cis* retinol (Kiser 2022). RPE65 je poznat i pod nazivom retinoid izomeraza ili retinol izomeraza. Nedostatak RPE65 povezan je sa razvojem Leberove kongenitalne amauroze (LCA) i asimptomatskih recesivnih formi retinitis pigmentoze (Kiser 2022). Takođe, RPE65 je jedan od prvih gena koji je zvanično odobren u okviru genske terapije ovih stanja.

Lecitin:retinol aciltransferaza (LRAT) se eksprimira u jetri i očima, a posebno u sklopu RPE sloja kao glavnog mesta skladištenja vitamina A (ili *all-trans* retinol) estara. Vitamin A dolazi do oka putem plazme uz pomoć retinoid-vezujućeg proteina (eng. *retinol-binding protein 4*, RBP4), a transportuje se u RPE preko RBP4 receptora stimulisanih retinoičnom kiselinom 6 (eng. *stimulated by retinoic acid 6*, STRA6), koji su eksprimirani na bazolateralnoj strani RPE ćelija (Sears i Palczewski 2016). Klinička važnost LRAT-a je inicijalno prepoznata zbog njegovih uloga u sklopu digestivnog trakta i jetre, dok je njegova važnost u sklopu ciklusa retinoida postala jasna pojavom mutacija koje se dovode u vezu sa razvojem ranih retinalnih distrofija (Sears i Palczewski 2016).

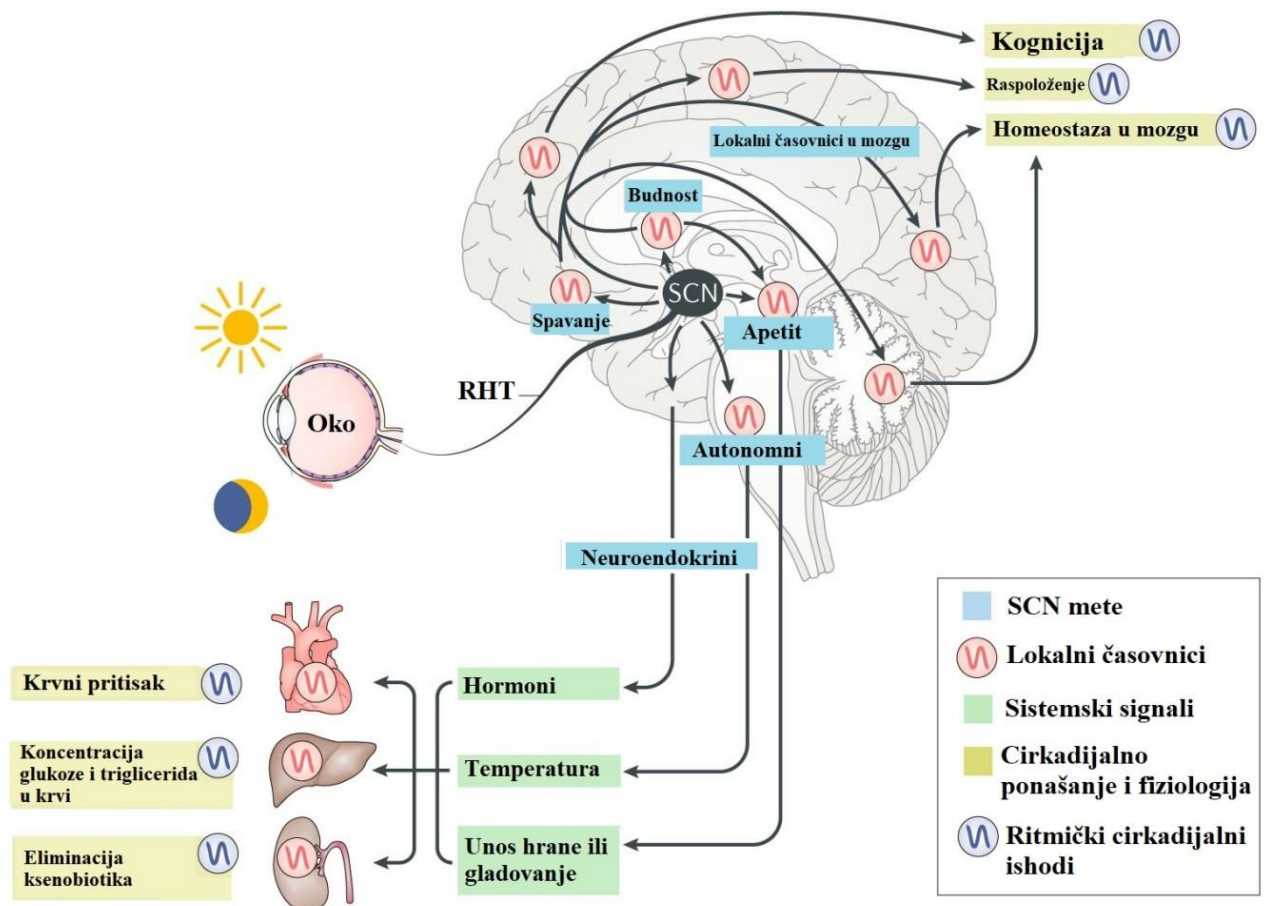
Među glavnim transkripcionim faktorima koji su neophodni za diferencijaciju RPE ćelija spadaju mikroftalmija-asocirani transkripcioni faktor (eng. *microphthalmia-associated transcription factor*, MITF) i orthodenticle homeoboks 2 (OTX2). Poremećaji u njihovoj funkciji dovode do transdiferencijacije RPE ćelija u nervno tkivo slično retini. SRY-boks transkripcioni faktor 9 (SOX9) aktivira BEST1 promotor u RPE sloju putem interakcije sa MITF i OTX2 (Masuda i sar. 2014). SOX transkripcioni faktori su važni regulatori

organogeneze i promoteri formiranja transkripcionih kompleksa putem olakšavanja interakcije između udaljenih mesta vezivanja. U sklopu retine, SOX9 se eksprimira u retinalnim progenitorskim ćelijama pre rođenja, ali je ekspresija ograničena na sloj Milerovih ćelija postnatalno (Masuda i sar. 2014). SOX9 ima glavnu ulogu u održavanju i preživljavanju postnatalnih Milerovih ćelija.

LHX2 je član LIM homeoboks porodice koji ima važnu ulogu u ranom razvoju oka, posebno u transformaciji optičkog pupoljka u optički kup (Masuda i sar. 2014). Nakon rođenja, LHX2 se uglavnom eksprimira u Milerovim ćelijama. Ovaj obrazac ekspimiranja sličan je onom koji se vidi kod SOX9.

1.7. Cirkadijalni ritam

Cirkadijalni ritam, poznat i kao biološki sat, je unutrašnji mehanizam koji reguliše fiziološke procese u telu na osnovu ciklusa od 24 sata. Ovaj ritam sinhronizuje različite funkcije tela sa spoljašnjim okruženjem, posebno sa ciklusom dana i noći (Gopalakrishnan i Kannan 2021). Cirkadijalni ritam utiče na spavanje, budnost, hormonsku sekreciju, metabolizam, telesnu temperaturu i mnoge druge biološke procese. Centralni pejsmejker za cirkadijalni ritam nalazi se u suprahijazmatskom jedru (SCN) hipotalamusa (Buijink i Michel 2021). SCN prima informacije o svetlosti iz oka preko retinohipotalamičkog trakta, omogućavajući sinhronizaciju unutrašnjeg biološkog časovnika sa spoljnim svetlosnim uslovima. SCN koordinira aktivnost drugih perifernih časovnika u telu kako bi se obezbedilo pravilno funkcionisanje organizma (Slika 1.11.) (Buijink i Michel 2021).



Slika 1.11. Organizacija cirkadijalnog ritma kod sisara

Prema: Hastings i sar. 2018.

Cirkadijalni ritam je kontrolisan genskom mrežom koja se sastoji od nekoliko ključnih gena i proteina. Geni *Clock* i *Bmal1* i njihovi proteinski produkti čine osnovni pozitivan regulatorni krug. CLOCK i BMAL1 proteini formiraju heterodimer koji se vezuje na E-box sekvence u promotorima ciljnih gena, pokrećući njihovu ekspresiju (Abe i sar. 2022). Geni *Period (Per) 1–2* i *Cryptochrome (Cry) 1–2* transkribuju se kao odgovor na aktivnost CLOCK/BMAL1 kompleksa. PER i CRY proteini formiraju kompleks koji se translokacijom premešta u jedro gde inhibira aktivnost CLOCK/BMAL1 kompleksa, po principu negativne povratne sprege (Abe i sar. 2022). Dodatna modulacija ekspresije *Clock* i *Bmal1* gena obavlja se putem aktivacije *orphan* receptora povezanog sa receptorom retinoične kiseline (ROR) i REV-ERB proteina čija ekspresija takođe zavisi od aktivnosti CLOCK/BMAL1 kompleksa.

Cirkadijalni ritam reguliše lučenje mnogih hormona, uključujući kortizol, hormon stresa, čiji su nivoi najviši ujutru, i insulin. Metabolički procesi su takođe pod uticajem cirkadijalnog ritma. Na primer, aktivnost jetrinih enzima koji učestvuju u detoksikaciji i metabolizmu nutrijenata varira tokom dana (Guan i Lazar 2022). Kognitivne funkcije, kao što su pažnja, memorija i reakcijsko vreme, fluktuiraju tokom dana u skladu sa cirkadijalnim ritmom (Xu i sar. 2021). Izloženost svetlosti, posebno plavoj svetlosti, ima značajan uticaj na cirkadijalni ritam. Rad u noćnim smenama može ozbiljno poremetiti cirkadijalni ritam, dovodeći do nesanice, umora i povećanog rizika za razne bolesti. Promene vremenskih zona mogu izazvati "jet lag", privremeni poremećaj cirkadijalnog ritma koji može dovesti do nesanice, umora i drugih simptoma (Wu i sar. 2019). Promene u obrascima spavanja, poput kasnog odlaska u krevet ili spavanja duže vikendom, mogu destabilizovati cirkadijalni ritam.

Poremećaji cirkadijalnog ritma mogu dovesti do brojnih zdravstvenih problema. Metabolički sindrom, koji uključuje dijabetes, gojaznost i povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti, je jedan od tih problema. Poremećaji cirkadijalnog ritma su povezani sa poremećajima raspoloženja, kao što su depresija i anksioznost (Wu i sar. 2019). Poremećaji spavanja mogu smanjiti kognitivne performanse i povećati rizik od neurodegenerativnih bolesti (Li i sar. 2021). Poremećaji cirkadijalnog ritma mogu oslabiti imunski odgovor i povećati osetljivost na infekcije. Za održavanje zdravog cirkadijalnog ritma, važna je pravilna izloženost prirodnoj svetlosti tokom dana i smanjenje izloženosti veštačkoj svetlosti tokom noći (Fishbein i sar. 2021). Odlazak na spavanje i buđenje u isto vreme svakog dana pomaže u stabilizaciji ritma. Izbegavanje stimulansa poput kofeina i elektronskih uređaja pre spavanja, kao i redovno vežbanje, mogu pomoći u stabilizaciji cirkadijalnog ritma (Ricketts i sar. 2022). Pravilno vreme obroka može podržati metaboličke procese u skladu sa cirkadijalnim ritmom.

Cirkadijalni ritam je fundamentalni aspekt ljudske fiziologije, i njegovo pravilno funkcionisanje je ključno za održavanje zdravlja i dobrobiti (Fishbein i sar. 2021). Razumevanje kako cirkadijalni ritam utiče na različite telesne funkcije može pomoći u unapređenju strategija za prevenciju i lečenje brojnih zdravstvenih stanja povezanih sa poremećajima ovog ritma.

1.7.1. Cirkadijalni ritam i poremećaj metabolizma glukoze

Poremećaj cirkadijalnog ritma igra važnu ulogu u patogenezi dijabetes melitusa. Kod ljudi, ritam dnevne tolerancije glukoze i insulinske senzitivnosti je viši u jutarnjim časovima i niži tokom noći (Bilu i sar. 2022). Slični obrasci cirkadijalnog ritma primećeni su i kod

miševa i pacova, međutim, uzimajući u obzir da ove životinjske vrste imaju drugačiji obrazac aktivnosti i spavanja u odnosu na ljude, njihova tolerancija na glukozu je viša u ranim jutarnjim časovima i niža tokom noći (Bilu i sar. 2022, Liu i sar. 2023). Fluktuacija u koncentraciji glukoze kontrolisana je centralnim časovnikom u SCN. U slučaju poremećaja SCN-a, regularne fluktuacije u koncentraciji glukoze, ekspresija gena glukoneogeneze u jetri i ritam insulinske senzitivnosti postaju narušeni. Pored toga, delecija *Clock* gena u jetri, pankreasu, mišićima ili celom telu životinja dovodi do smanjenih nivoa insulina, intolerancije na glukozu i povišenih vrednosti šećera u krvi (Liu i sar. 2023). Ovi nalazi naglašavaju značaj pravilne funkcije cirkadijalnog ritma za održavanje pravilnog metabolizma glukoze i ukazuju na to da poremećaji u ovom ritmu mogu doprineti razvoju komplikacija kao što su povišena vrednost glikemije, što može rezultirati razvojem dijabetes melitusa i posledično razvojem DR-a.

1.7.2. Periferni časovnik u retini

Periferni časovnik u retini bio je prvi cirkadijalni oscilator otkriven van SCN kod sisara (Tosini i Menaker 1996). Nekoliko studija je pokazalo da mnogi aspekti fiziologije i funkcije retine zavise od ovog časovnika (Baba i sar. 2018). Slično kao i u SCN, retinalni časovnik se sastoji od auto-regulatornih transkripciono-translacionih sistema negativne povratne sprege koji obuhvataju nekoliko *Clock* gena i njihovih proteinskih produkata. Prvi obuhvata dva bazična heliks-petlja-heliks-PAS domena transkripcionih faktora, CLOCK i BMAL1 koji formiraju heterodimer, a zatim se vezuju za E-box sekvence gena *Per1*, *Per2*, *Cry1* i *Cry2* kako bi povećali njihovu transkripciju kao i u SCN (Baba i sar. 2018). Drugi obuhvata negativnu i pozitivnu transaktivaciju ostalih 5 gena, *Rev-erb α* , *β* i *Ror α* , *β* , *c* putem REV-ERB/ROR (RRE) elemenata u promotorskim regionima. REV-ERB zatim inhibira dalju transkripciju *Clock* i *Bmal1*, dok ROR deluje suprotno, promovišući transkripciju *Clock* i *Bmal1* gena (Jidigam i sar. 2022). Transkripcija *Rev-erb* i *Ror* gena je regulisana E-box sekvencom u njihovim promotorskim regionima. REV-ERB i ROR proteini se takmiče za vezivanje na RRE u *Bmal1* promotorskoj regiji kako bi regulisali ritmičku ekspresiju *Bmal1* gena. Isti princip važi i za druge *Clock* kontrolisane gene. Eksperimentalne studije su pokazale da su *Clock* geni ritmički eksprimirani u različitim slojevima retine kod miševa, dok u sloju fotoreceptora, samo čepići eksprimiraju sve cirkadijalne Clock proteine (Baba i sar. 2018).

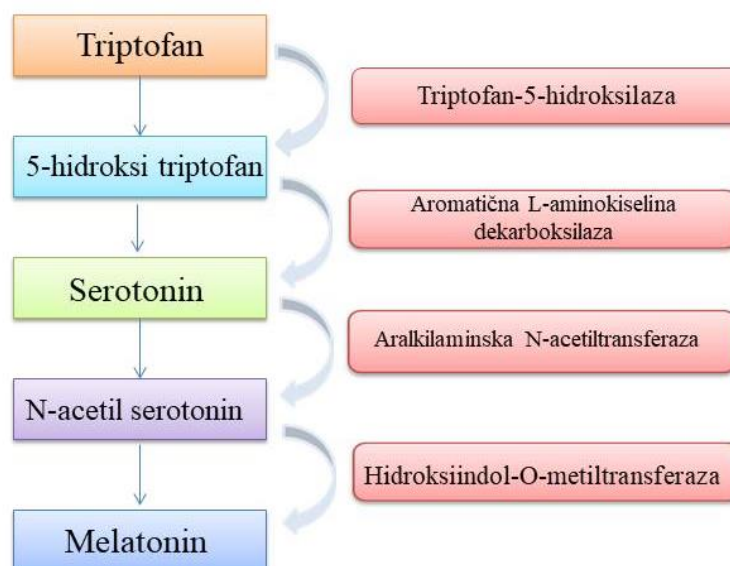
Bmal1 gen predstavlja ključnu komponentu cirkadijalnog časovnika kod sisara. Studije su pokazale da miševi sa nedostatkom *Bmal1* gena (*Bmal1*^{-/-}) ne pokazuju cirkadijalnu ritmičnost što dovodi po razvoja brojnih patoloških stanja (Baba i sar. 2018). *Bmal1*^{-/-} miševi ubrzano stare i životni vek im je redukovana za oko 9 meseci (Baba i sar. 2018). U retini miševa, *Bmal1* je eksprimiran u različitim ćelijama, ali je u sloju fotoreceptora prisutan isključivo u čepićima (Jidigam i sar. 2022). Studije su pokazale da nedostatak *Bmal1* gena dovodi do poremećaja funkcije ostalih gena u retini miševa. Takođe, nedostatak ovog gena dovodi do češće pojave katarakte i inflamacije rožnjače tokom starenja (Baba i sar. 2018).

1.8. Melatonin

Melatonin je hormon koji proizvodi epifiza u mozgu. Poznat kao "hormon tame", melatonin se luči u većim količinama tokom noći i igra ključnu ulogu u regulisanju cirkadijalnog ritma i ciklusa budnost-spavanje (Ahmad i sar. 2023). U proseku, epifiza proizvodi između 0,1 i 0,9 mg melatonina dnevno (Minich i sar. 2022). Proizvodnja melatonina kod beba počinje uspostavljanjem cirkadijalnog ritma, oko trećeg meseca života

(Gombert i sar. 2021). Do tada, bebe koje doje koriste melatonina iz majčinog mleka. Nivoi melatonina rastu od ranog detinjstva do adolescencije, dostižući vrhunac u pubertetu (Gombert i sar. 2021, Minich i sar. 2022). Deca obično proizvode više melatonina nego odrasli, što može značiti da njihova potreba za dodacima ishrani mora biti ograničena na specifična zdravstvena stanja. Proizvodnja melatonina postepeno opada kako ljudi stare, počevši od kasnih dvadesetih do pedesetih godina, pri čemu se proizvodnja stabilizuje na približno 30 pg/mL (Minich i sar. 2022).

Melatonin se sintetiše iz aminokiseline triptofana, koja se pretvara u serotonin, a zatim u melatonin (Slika 1.12.). Proces sinteze je regulisan ciklusom svetlost-tama. Informacije o svetlosti dolaze iz retine i prenose se preko retinohipotalamičnog trakta do SCN u hipotalamusu. SCN koordinira dnevne ritmove i signalizira epifizi da proizvodi melatonin tokom noći. Tokom večeri, kada se nivo svetlosti smanji, povećava se proizvodnja melatonina, signalizirajući telu da je vreme za spavanje. Melatonin smanjuje vreme potrebno da se zaspi i poboljšava kvalitet sna. Proizvodnja melatonina se smanjuje tokom jutra, kada nivo svetlosti raste, pomažući telu da se probudi.



Slika 1.12. Sinteza melatonina

U početku se verovalo da se melatonin sintetiše isključivo u epifizi. Kasnije je otkriveno da je retina još jedno mesto sinteze melatonina gde takođe pokazuje cirkadijalni ritam (Bocheva i sar. 2022). Do danas je otkriveno da skoro sve ćelije, tkiva i organi kičmenjaka sadrže melatonin i poseduju mehanizam za sintezu melatonina. Najveće količine melatonina se ne proizvode u epifizi, već u crevima i koži (Bocheva i sar. 2022). U ovim organima, proizvodnja melatonina nije regulisana ciklusom svetlost-tama, već je regulisana lokalnim zahtevima tkiva, što čini osnovu za inducibilno svojstvo sinteze melatonina.

U poređenju sa sintezom, metabolizam melatonina je manje proučavan. Dugo se verovalo da je 6-hidroksimelatonin jedini važan proizvod metabolizma melatonina, pa je većina istraživanja bila usmerena na njega. U stvari, metabolizam melatonina je veoma složen proces, a 6-hidroksimelatonin je samo jedan od mnogih metabolita (Tan i Reiter 2020). Melatonin se metaboliše enzimskim procesom, pseudo-enzimskim procesom ili interakcijom sa ROS i RNS. Zanimljivo je da se melatonin takođe može metabolisati neenzimskim procesom. Interakcija melatonina sa ROS i RNS stvara različite metabolite uključujući:

ciklični 3-hidroksimelatonin, 2-hidroksimelatonin, 4-hidroksimelatonin, N-nitrozomelatonin, N-(1-formil-5-metoksi-3-okso-2,3-dihidro-1H-indol-2-ilidenmetil) acetamid, N-acetil-N-formil-5-metoksikinuramin, N1-acetil-5-metoksikinuramin i druge (Tan i Reiter 2020). Pretpostavka je da se tokom izraženog oksidativnog stresa većina melatonina metaboliše interakcijom sa ROS, jer oksidativni stres značajno smanjuje nivo ukupnog melatonina u telu.

Pored svoje uloge u regulaciji spavanja, melatonin je snažan antioksidans koji pomaže u neutralizaciji ROS i drugih slobodnih radikala. Antioksidativna svojstva melatonina pomažu u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa i oštećenja DNK, lipida i proteina (Talib i sar. 2021). Melatonin takođe pojačava aktivnost drugih antioksidanasa, kao što su glutation i SOD. Melatonin ima imunomodulatorna svojstva i pomaže u regulaciji imunskog odgovora (Chitimus i sar. 2020). Može pojačati aktivnost imunoloških ćelija, kao što su T-limfociti i makrofagi, i smanjiti produkciju proinflamatornih citokina. Ovo može pomoći u zaštiti tela od infekcija i upalnih procesa (Givler i sar. 2023). Melatonin može pomoći u regulaciji telesne temperature, krvnog pritiska i nivoa hormona u skladu sa dnevnim ritmom (Moon i sar. 2022). Melatonin se koristi kao dodatak za lečenje različitih poremećaja spavanja, uključujući insomniju i poremećaje cirkadijalnog ritma (Givler i sar. 2023). Uzimanje melatonina može pomoći u smanjenju simptoma jet laga i poboljšanju sna kod ljudi koji rade u noćnim smenama. Melatonin se takođe istražuje kao potencijalni tretman za depresiju, anksioznost, migrenu, Alchajmerovu bolest, kardiovaskularne bolesti i neke vrste karcinoma (Chitimus i sar. 2020, Moon i sar. 2022, Talib i sar. 2021).

Melatonin se smatra bezbednim za kratkotrajnu upotrebu, ali dugoročna sigurnost nije dovoljno istražena. Doze melatonina variraju u zavisnosti od specifičnih potreba i individualnih razlika, ali se obično kreću od 0,5 do 10 mg (Givler i sar. 2023). Prekomerna upotreba melatonina može izazvati nuspojave kao što su dnevna pospanost, glavobolja, vrtoglavica i razdražljivost.

1.8.1. Sinteza melatonina u retini

Prvi dokazi da se melatonin sintetiše u retini potiču iz 1980. godine, kada su Paul Pévet i saradnici otkrili da se ključni enzim koji učestvuje u sintezi melatonina, hidroksiindol-O-metiltransferaza (eng. *hydroxyindole O-methyltransferase*, HIOMT), nalazi u tkivu retine miševa, krtice i zlatnog hrčka (Pévet i sar. 1980). Par godina kasnije, Besharse i Iuvone su otkrili da se ritmička aktivnost još jednog ključnog enzima u sintezi melatonina, aril-alkilamin N-acetiltransferaze (eng. *arylalkylamine N-acetyltransferase*, AANAT), održava u *in vitro* uslovima i danima nakon enukleacije afričke kandžaste žabe (lat. *Xenopus laevis*) (Besharse i Iuvone 1983). Iako se o sintezi, regulaciji i tačnim funkcijama melatonina u retini još uvek nedovoljno zna, dostupni podaci ukazuju na to da se sinteza melatonina u retini odlikuje aktivacijom istih enzima koji učestvuju i u sintezi melatonina u epifizi (AANAT i HIOMT) (Felder-Schmittbuhl i sar. 2024).

Melatonin se vezuje za melatoninske receptore tipa 1 (MT1) i tipa 2 (MT2) koji pripadaju porodici receptora povezanih sa G proteinom (eng. *G-protein coupled receptor*, GPCR). Oba tipa receptora su pronađena u tkivu retine kičmenjaka (Felder-Schmittbuhl i sar. 2024). U tkivu retine, melatoninski receptori se nalaze u sloju fotoreceptora, unutrašnjem nuklearnom sloju i sloju retinalnih ganglijskih ćelija. Klosen i saradnici su koristeći knock-in MT-LacZ miševu otkrili da se oba tipa receptora nalaze u manjoj subpopulaciji neurona u sklopu INL i GCL, ali i da se u sklopu čepića mogu naći samo MT1 receptori (Klosen i sar. 2019). Melatonin se primarno sintetiše i oslobađa iz sloja fotoreceptora tokom noći, a zatim se vezuje za receptore eksprimirane na svim nuklearnim slojevima kao što su fotoreceptori,

horizontalne ćelije, bipolarne ćelije, amakrine ćelije i RGC. Pored direktnog dejstva putem MT1 i MT2 receptora, svoje indirektno dejstvo melatonin ispoljava putem modulacije oslobađanja dopamina i posledične modulacije aktivnosti dopaminskih receptora (Felder-Schmittbuhl i sar. 2024).

Studije su pokazale da melatonin ima važnu ulogu u zaštiti fotoreceptora od oksidativnog stresa, kao i da sprečava apoptozu fotoreceptora u modelu miševa sa retinitis pigmentosom (Felder-Schmittbuhl i sar. 2024). Poremećaji u signalnom putu melatonina mogu dovesti do nakupljanja lipofuscina u RPE sloju. Takođe je utvrđeno da melatonin štiti čepiće tokom procesa starenja, što je posebno važno jer su čepići tip fotoreceptora koji najčešće strada u sklopu senilne degeneracije makule (Felder-Schmittbuhl i sar. 2024). Pored toga, istraživanja su pokazala da je produkcija melatonina kod pacijenata sa senilnom degeneracijom makule niža u odnosu na kontrolnu grupu istih godina, dok dnevna upotreba melatonina u dozi od 3 mg ima protektivni efekat i usporava progresiju obe bolesti (Felder-Schmittbuhl i sar. 2024).

Oksidativni stres i inflamacija igraju ključnu ulogu u razvoju DR-a i anksioznosti. Melatonin, sa svojim snažnim antioksidativnim i antiinflamatornim delovanjem, kao i sposobnošću da poboljša integritet krvnih sudova i deluje antiapoptotski, može doprineti ublažavanju ovih stanja. S obzirom na to da je mrak glavni stimulan za lučenje melatonina, smatra se da skraćeno dnevno izlaganje svetlosti može podstaći njegovu sekreciju, što bi moglo imati pozitivan efekat na simptome DR-a i anksioznosti. Ipak, uticaj skraćenog izlaganja svetlosti na nivo melatonina i njegova uloga u regulaciji oksidativnog stresa u mozgu, inflamatornih procesa, metabolizma holesterola i vizuelnog ciklusa u retini još uvek nisu dovoljno istraženi.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja sprovedenih u sklopu ove doktorske disertacije bili su da se kod životinja sa streptozotocinom (STZ) indukovanim dijabetes melitusom:

1. Ispita uticaj skraćenog dnevnog izlaganja svetlosti na:
 - ponašanje slično anksioznosti i eksplorativno ponašanje,
 - oksidativni stres u mozgu.
2. Utvrdi dejstvo skraćenog dnevnog fotoperioda na:
 - propustljivost krvnih sudova retine,
 - ekspresiju akvaporina 4 i glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP),
 - ekspresiju gena za proinflamatorne citokine, vizuelni ciklus i metabolizam holesterola u retini i retinalnom pigmentnom epitelu (RPE).
3. Ispita uticaj skraćenog dnevnog fotoperioda na lipidni status i profil masnih kiselina u triacilglicerolima seruma pacova sa DM.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* starosti 8 nedelja, telesne mase 170-200 g koji su uzgajani u vivarijumu Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su čuvane u odvojenim polikarbonatnim kavezima dimenzija 55x35x30 cm, a pod standardnim laboratorijskim uslovima za životinje (temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha 50%, ciklusi svetla/tame 12/12 sati sa uključivanjem svetla u 9 časova pre podne. Tokom trajanja eksperimenta voda i hrana su bili dostupni *ad libitum*.

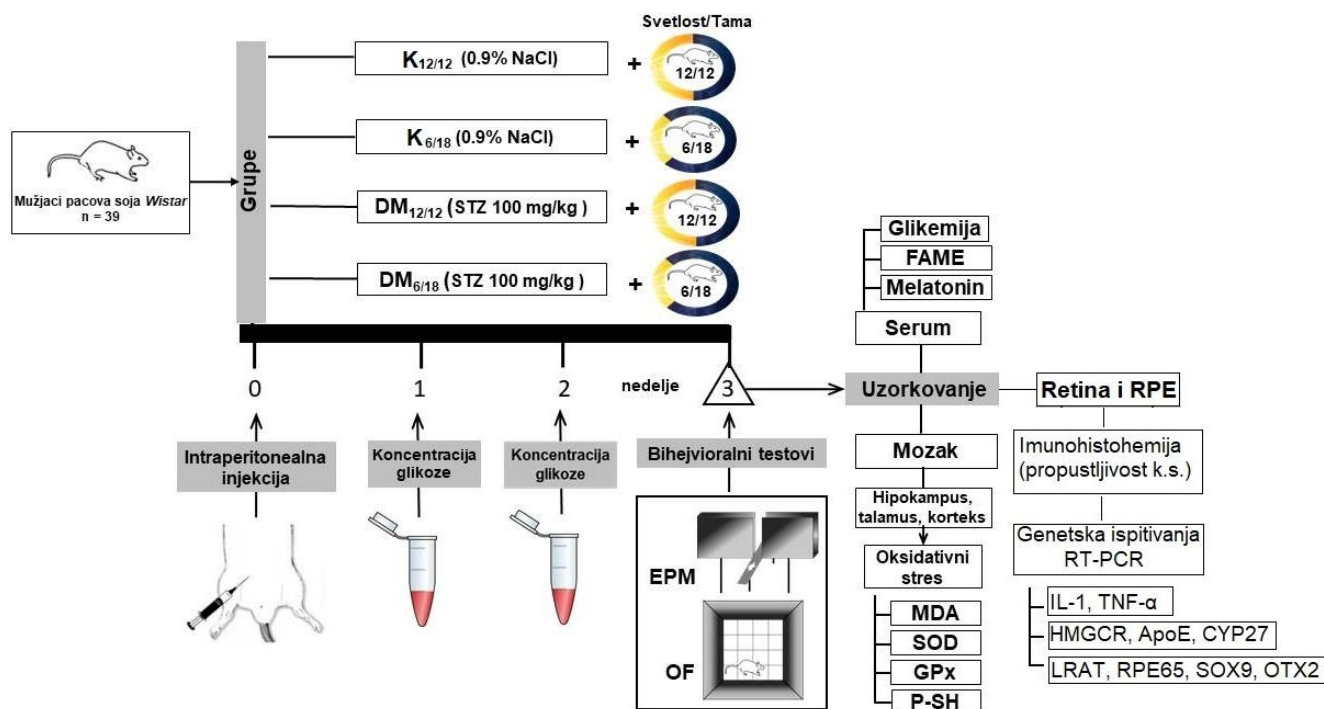
Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63/EU) i odobreni su od strane Etičkog komiteta za brigu o životinjama Univerziteta u Beogradu (broj dozvole 9101/1).

3.2. Eksperimentalni protokol

Eksperimentom je obuhvaćen uzorak od 39 pacova koji su nasumično podeljeni u jednu od navedenih grupa:

1. kontrolna grupa ($K_{12/12}$; $n=8$) tretirana fiziološkim rastvorom izložena ciklusu svetlost/tama 12/12h;
2. grupa sa dijabetesom izložena ciklusu svetlost/tama 12/12h ($DM_{12/12}$; $n=11$);
3. grupa tretirana fiziološkim rastvorom na ciklusu svetlost/tama 6/18h ($K_{6/18}$; $n=8$);
4. grupa sa dijabetesom izložena ciklusu svetlost/tama 6/18h ($DM_{6/18}$; $n=12$).

Dijabetes je indukovano jednokratnom intraperitonealnom injekcijom STZ (100 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) sveže razblaženog u natrijum citratnom puferu na pH 4,5 (Ito i sar. 2001, Kim i sar. 2006, Chen i Ianuzzo 1982). Životinje iz $K_{12/12}$ i $K_{6/18}$ grupa su umesto STZ bile tretirane 0,9% rastvorom NaCl-a. Pacovi su bili podvrgnuti odgovarajućem ciklusu svetlost/tama u trajanju od 3 nedelje, počev od dana administracije STZ ili NaCl (Furman 2015). Posle 7 dana merena je koncentracija glukoze iz krvi repne vene, a pacovi sa glikemijom $>16,5$ mmol/L korišćeni su u daljoj studiji. Koncentracija glukoze u krvi iz repne vene i telesna masa merene su svakih sedam dana. Nakon 3 nedelje ponašanje koje odgovara anksioznosti, lokomotorna aktivnost i eksplorativno ponašanje bili su ispitani uzdignutim krstastim lavirintom i testom otvorenog polja. Nakon bihevioralnih testova uzorci krvi su prikupljeni za određivanje koncentracije melatonina, pokazatelja poremećaja cirkadijalnog ritma, ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) metodom. Uzorci mozga su prikupljeni za određivanje parametara oksidativnog stresa, dok su u uzorcima retine i RPE određivane ekspresije gena za proinflamatorne citokine (IL-1, TNF- α) i metabolizam holesterola (HMGCR, ApoE, CYP27). Ekspresija gena vizuelnog ciklusa (LRAT, RPE65, SOX9, OTX2) praćena je samo u RPE sloju. Propustljivost krvnih sudova za lektin i ekspresija GFAP i akvaporina 4 određivana je imunohistohemijskom metodom (Slika 3.1.).



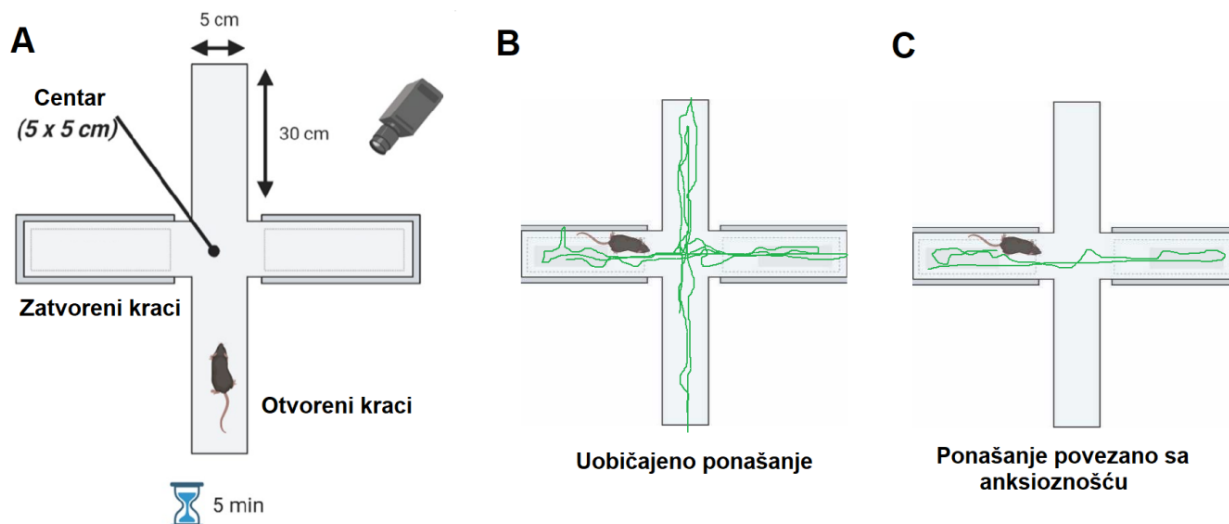
Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimenta

Skraćenice: MDA = malondialdehid; SOD = superoksid dizmutaza; GPx = glutation peroksidaza; P-SH = tiolne grupe proteina; STZ = streptozotocin; FAME = metil esteri masnih kiselina; EPM = uzdignuti krstasti lavirint (engl. elevated plus maze); OF = otvoreno polje (engl. open field).

3.3. Bihevioralni testovi

3.3.1. Uzdignuti krstasti lavirint

Uzdignuti krstasti lavirint je test za ispitivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću, koji se zasniva na urođenoj potrebi pacova da istražuju novu sredinu i urođenom strahu od nezaštićenih, svetlih i uzdignutih površina. Lavirint se sastoji od dva otvorena i dva zatvorena kraka (kraci 50x10 cm, zidovi visine 40cm) koji su izdignuti iznad podloge (50 cm) i između kojih se nalazi centralna platforma (Slika 3.2.A). Životinja se postavlja na centralnu platformu i ostavlja 5 minuta da samostalno istražuje lavirint. Ponašanje i kretanje svake životinje registrovano je kamerom (HicVision Bullet 2612) (Walf i Frye, 2007). Bihevioralni parametri koji su analizirani uključuju broj ulazaka u otvorene i zatvorene krake, vreme provedeno u otvorenim i zatvorenim kracima i ukupan broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih kraka. Ulazak u krak definisan je ulaskom sva 4 ekstremiteta životinje. Anksioznost se ispoljava dužim vremenom boravka u zatvorenim kracima i povećanim brojem ulazaka u zatvorene krake (Slika 3.2.B i C). Posle ispitivanja svake pojedinačne životinje, lavirint je čišćen 70% etanolom.

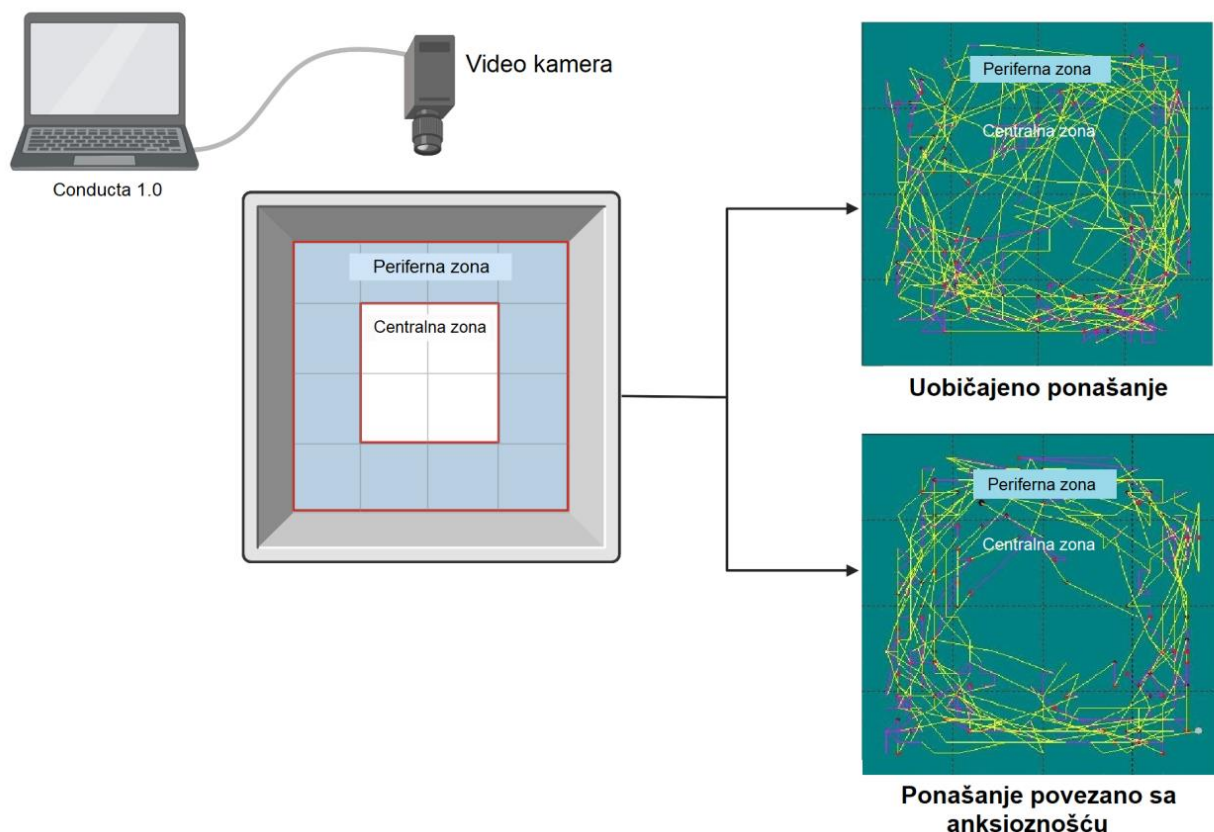


Slika 3.2. Šematski prikaz testa uzdignutog krstastog lavirinta

Izgled platforme (A). Šematski prikaz izvođenja testa uzdignutog krstastog lavirinta sa prikazom trase kretanja životinje uobičajenog ponašanja (B) i životinje koja pokazuje ponašanje povezano sa anksioznošću (C).

3.3.2. Test otvorenog polja

Test otvorenog polja se koristi za ispitivanje lokomotorne aktivnosti, eksplorativnog ponašanja i anksioznosti. Test se izvodi u zvučno izolovanoj kutiji koja je opremljena infracrvenim zracima i automatizovanim sistemom sa infracrvenim senzorima (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska) za registrovanje motorne aktivnosti životinja. Sistem registruje horizontalnu i vertikalnu aktivnost životinja. Osnova zvučno izolovane kutije – otvorenog polja (površine 48x48 cm, zidova visine 40 cm) podeljena je virtuelno na 16 jednakih kvadrata i osvetljena crvenim svetlom jačine 12 lx. Kvadrati koji se nalaze u neposrednom kontaktu sa zidovima kutije čine perifernu, dok 4 centralna kvadrata čine centralnu zonu otvorenog polja. Ukupno trajanje testa je 15 minuta, a za analizu kretanja životinja korišćen je odgovarajući softver (Conducta 1.0) (Hrncic i sar. 2016, Ramos i sar. 2003). Analizirani parametri obuhvatili su ukupan pređeni put, vreme kretanja, broj ulazaka i vreme provedeno u centralnoj zoni otvorenog polja, broj propinjanja na zadnje ekstremitete i indeks tigmotaksije. Ukupan put i vreme kretanja, kao i broj propinjanja na zadnje ekstremitete su pokazatelji lokomotorne aktivnosti i u izvesnoj meri eksplorativnog ponašanja i anksioznosti. Broj ulazaka u centralno polje i vreme provedeno u centru su pokazatelji eksplorativnog ponašanja i anksioznosti. Indeks tigmotaksije predstavlja odnos pređenog puta u perifernim zonama i ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja i jedan je od najznačajnijih pokazatelja anksioznog ponašanja (Slika 3.3.).



Slika 3.3. Šematski prikaz testa otvorenog polja

Šematski prikaz izvođenja testa u otvorenom polju sa prikazom trajektorije životinje koja pokazuje uobičajeno ponašanje i trajektorije životinje koja pokazuje ponašanje povezano sa anksioznošću.

3.4. Imunohistohemijska analiza

U cilju procene propustljivosti krvnih sudova u retini i angiogeneze uzorci retine su bojani lektinom (nakupljanje lektina u retini ukazuje na povećanu propustljivost krvnih sudova), dok je aktivacija astrocita i Milerovih ćelija procenjena na osnovu ekspresije GFAP. Nakon enukleacije bulbusi su fiksirani u 4% paraformaldehidu na 4°C preko noći, zaštićeni u 30% saharozi i tretirani 7,5% želatinom:15% saharozom. U analizi su korišćeni preseći debljine 18 µm. Nakon deželatinizacije u fiziološkom rastvoru puferrisanom fosfatima (engl. *phosphate buffered saline*, 1xPBS) na 37°C tokom 30 minuta i permeabilizacije Tritonom (0,5%) tokom 15 minuta, nespecifično vezivanje antitela je blokirano 1% goveđim serumskim albuminom u 1xPBST (0,1% Triton u 1xPBS) tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su inkubirani sa primarnim antitelima (mišjim anti-GFAP, zečjim anti-akvaporin 4 i zečjim anti-lektin) tokom noći na 4°C. Preseci su zatim isprani u 1xPBST i inkubirani sa sekundarnim anti-zečjim i anti-mišjim antitelima konjugovanim sa Alexa 568 i Alexa 488 (1:500 u PBS) tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u PBS-u, preparati su tretirani bojom za vizuelizaciju jedra (DAPI), nakon čega je ekspresija lektina, GFAP i akvaporina 4 procenjena fluorescentnom mikroskopijom (Shao i sar. 2020). Slike su dobijene korišćenjem mikroskopa Axio Observer Z1 pomoću softverskog sistema AxioVision 4.6. (Carl Zeiss, Nemačka) pri uvećanju od 20x. Imunoreaktivnost lektina i GFAP-a određivana je na nivou INL-a i RGC-a, dok je ukupna reaktivnost Aqp4 određivana na nivou INL-a. Imunoreaktivnost je kvantifikovana kao procenat ukupne površine koja je pozitivna na lektin,

GFAP i Aqp4 kao što je ranije navedeno (Shao i sar. 2020). Za perivaskularnu kvantifikaciju Aqp4-a, korišćen je lektin. Analiza je učinjena korišćenjem ImageJ softvera.

3.5. Određivanje ekspresije gena

Ekspresija gena je određena kvantitativnom reakcijom lančane polimerizacije sa reverznom transkriptazom (engl. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR). Ukupna RNK je ekstrahovana iz retine i RPE-a korišćenjem Trizola. Jedan mikrogram ukupne RNK je reverznom transkriptazom preveden u komplementarnu DNK, a zatim je izvedena RT-PCR analiza na Line Gene-K fluorescentnom PCR sistemu za detekciju u realnom vremenu. Reakciona smeša za RT-PCR sadržala je Pover SYBR™ Green/PCR Master Miks, 0,75 ml prajmera, 2 ml komplementarne DNK i 1,5 ml vode za PCR. Svaki ciklus se sastojao od početne denaturacije na 50°C tokom 2 minuta i 95°C tokom 2 minuta, nakon čega je usledilo 40 ciklusa denaturacije (95°C, 30 s), vezivanja prajmera (60°C, 30 s) i elongacije (72°C, 60 s). Prikupljanje podataka je izvršeno u svakom koraku elongacije. Specifičnost PCR proizvoda je proverena analizom krive topljenja, a relativni nivo ekspresije gena procenjen korišćenjem komparativne $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode. Relativni nivoi ekspresije informacione RNK za svaki uzorak su izračunati kao odnos između ekspresije gena od interesa i ekspresije beta aktina kao endogene kontrole.

Tabela 3.1. Lista prajmera korišćenih za kvantifikaciju gena uključenih u vizuelni ciklus (*SOX9*, *RPE65*, *LRAT*, *OTX2*), metabolizam holesterola (*APOE*, *HMGCR*, *CYP27*) i proinflamatorne citokine (*IL-1*, *TNF- α*) metodom real-time kvantitativne lančane reakcije polimeraze (RT-qPCR). Beta aktin je korišćen kao endogena kontrola. F-forward, R-reverse.

<i>SOX9</i>	F: CTGAAGGGCTACGACTGGAC R: TACTGGTCTGCCAGCTTCCT
<i>RPE65</i>	F: ATGACCGAGAAGAGGATTGTC R: CTGCTTTCAGTGGAGGGATC
<i>LRAT</i>	F: TTTGTGACCTACTGCAGATACGGC R: CATATATGATGCCAGGCCTGTGTAG
<i>OTX2</i>	F: ACCCAGACATCTTCATGCGG R: TCTGACCTCCGTTCTGTTGC
<i>IL-1</i>	F: GCAATGGTTCGGGACATAGTT R: AGACCTGACTTGGCAGAGGA
<i>TNF-α</i>	F: ACCACGCTCTTCTGTCTACTG R: CTTGGTGGTTTGCTACGAC
<i>APOE</i>	F: TTCTGACCAGGTCCAGGAAGAG R: TTACTTCCGTCATAGTGTCTCCAT
<i>CYP27</i>	F: GTGTCCCGGGATCCCAGTGT R: CTTCTCAGCCATCGGTGA
<i>HMGCR</i>	F: GAGCGTTCGTGGGTCCAG R: GGCACAACCTGCCGTATCTA
<i>Beta Actin</i>	F: CCTCTATGCCAACACAGT R: AGCCACCAATCCACACAG

3.6. Biohemijske analize

3.6.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Ukupan sadržaj proteinskih tiolnih grupa u mozgu pacova je utvrđen prema metodi koja se zasniva na reakciji tiolnih grupa sa Ellman-ovim reagensom (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB) (Jocelyn 1987). Proteinske tiolne grupe reaguju sa DTNB cepajući disulfidnu vezu čime nastaje 2-nitro-5 tiobenzoat (TNB-). TNB-dalje jonizuje u neutralnom ili alkalnom pH na TNB²⁻-dianjon koji ima žutu boju. Intenzitet boje meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini 412 nm.

Nivo malondialdehida (MDA) je određen pomoću kompetitivnog enzimskog imunoeseja (Elabscience, Wuhan, China, Catalog No: E-EL-0060) prema upustu proizvođača. Promena boje je izmerena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija MDA izražena je u ng/ml.

Aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx) određena je spektrofotometrijskom metodom (Misra i Fridovich 1972, Flohé i Günzler 1984). Aktivnost SOD je određena na osnovu procenta inhibicije autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini (pH=10,2), dok je aktivnost GPx određena na osnovu oksidacije NADPH u prisustvu vodonik peroksida na 340 nm.

3.6.2. Određivanje lipida i masnih kiselina

Koncentracija holesterola u lipoproteinima velike gustine (eng. *high density lipoprotein*, HDL) je određena enzimskom metodom korišćenjem holesterol esteraze i holesterol oksidaze. Holesterol esteraza razgrađuje estere holesterola na slobodni holesterol i masne kiseline, dok holesterol oksidaza oksidiše holesterol u Δ^4 -holestenon i vodonik peroksid. Reakcija vodonik peroksida sa 4-amino-antipurin-natrijumom i N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilinom (HSDA) uz peroksidazu rezultira formiranjem ljubičasto-plave boje, čiji intenzitet je proporcionalan koncentraciji HDL holesterola u uzorku (Sugiuchi i sar. 1995).

Koncentracija triacilglicerola (TRG) u serumu je određena metodom po Wahlefeldu (1974). Najpre su TRG hidrolizovani do glicerola i masnih kiselina korišćenjem lipoproteinske lipaze iz mikroorganizama, a zatim se glicerol oksiduje do dihidroksiaceton fosfata i vodonik peroksida. Reakcija vodonik peroksida sa 4-aminofenazonom i 4-hlorfenolom pod katalitičkim dejstvom peroksidaze rezultuje formiranjem crvene boje, čiji intenzitet je direktno proporcionalan koncentraciji TRG u uzorku.

Koncentracija ukupnih holesterolskih estara je određena nakon hidrolize holesterol esterazom kako bi se dobio slobodni holesterol i masne kiseline. Holesterol oksidaza zatim katalizuje oksidaciju holesterola do holest-4-en-3-ona i vodonik peroksida. U prisustvu peroksidaze, vodonik peroksid podstiče oksidativno vezivanje fenola i 4 aminofenazona pri čemu se formira hinonimin crvene boje (Sugiuchi i sar. 1995).

U cilju određivanja profila masnih kiselina u TRG seruma, lipidi iz uzoraka krvi su trans-esterifikovani do metil estara slobodnih masnih kiselina korišćenjem 3M hlorovodonične kiseline u metanolu uz dodatak 10 mg butilovanog hidroksitoluena na 85°C (Schlechtriem i sar. 2008, Zhou i sar. 2018). Uzorci su zatim preneti na sobnu temperaturu, pomešani sa heksanom i centrifugirani na 3000 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Gornja faza je

pokupljena i osušena na blagoj pari N₂. Svi uzorci su bili rastvoreni u heksanu pre analize. Metil estri slobodnih masnih kiselina su razdvojeni gasnim hromatografom (Shimadzu GC-2014, Kyoto, Japan) koji je opremljen detektorom jonizacije plamena i RTX 2330 kolonom (RESTEK, Bellefonte, PA) dužine 60 m, unutrašnjeg dijametra od 0,25 mm i debljine filma od 0,2 μm. Temperature injektora i detektora su podešene na 220 i 250°C. Parametri temperature u koloni su podešeni na sledeće vrednosti: 100°C u trajanju od 5 min sa postepenim povećanjem do 175°C brzinom 10 °C/min; 175°C u trajanju od 27 min sa postepenim povećanjem do 220°C brzinom od 3 °C/min i 220°C u trajanju od 35 min. Slobodne masne kiseline su određene poređenjem vremena zadržavanja sa PUFA-2 i Supelco 37 smešom (Supelco, Inc., Bellefonte, PA), a koncentracija pojedinačnih masnih kiselina u serumu izražena kao procenat od ukupno identifikovanih masnih kiselina u ukupnoj količini lipida u tkivu. U eksperimentu su određene koncentracije sledećih masnih kiselina: palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0), palmitoleinske (C16:1ω7), oleinske (C18:1ω9), vakkenske (C18:1ω7), linoleinske (C18:2ω6), γ-linoleinske (C18:3ω6), dihomο-γ-linoleinske (C20:3ω6), arahidonske (C20:4ω6), dokozatetraenoinske (C22:4ω6), α-linoleinske (C18:3ω3), eikozapentaenoične (C20:5ω3), dokozapentaenoične (C22:5ω3) i dokozaheksaenoične kiseline (C22:6ω3).

3.7. Statistička analiza

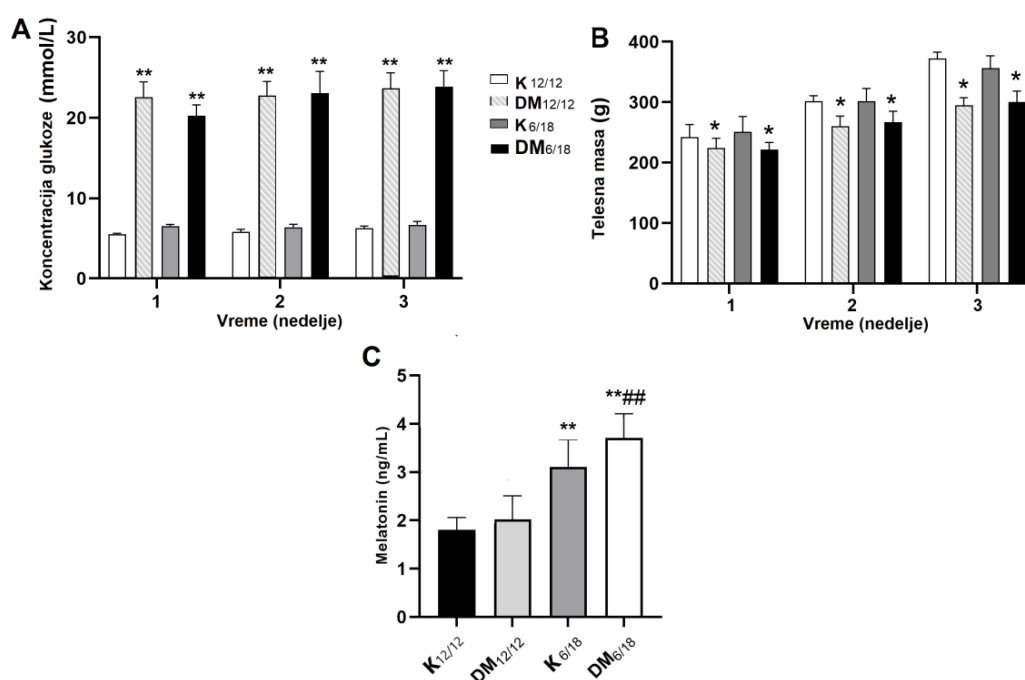
Svi analizirani parametri su testirani na normalnost raspodele podataka pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. U zavisnosti od distribucije podataka značajnost razlike je procenjena parametarskom dvostrukom analizom varijanse (ANOVA) sa Danetovim (Dunnnett) post hoc testom ili neparametarskim Kraskal-Volisovim (Kruskall-Wallis) testom sa Man-Vitnijevim (Mann-Whitney) *post hoc* testom. Statistička analiza je izvršena korišćenjem SPSS22.0 programa, a razlika je smatrana statistički značajnom ako je $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Koncentracija glukoze u krvi i melatonina u serumu

Merenjem nivoa glukoze u krvi nedelju dana nakon administracije STZ-a nađeno je da 9/11 životinja iz grupe DM_{12/12} i 10/12 životinja iz grupe DM_{6/18} ima razvijenu hiperglikemiju. Ove životinje su uključene u dalju analizu. Stopa mortaliteta je bila 2/9 u grupi DM_{12/12} i 2/10 u grupi DM_{6/18} do kraja eksperimentalnog protokola. Nivoi glukoze su bili značajno viši u grupi DM_{12/12} ($22,5 \pm 1,9$ mmol/L) u poređenju sa grupama K_{12/12} ($5,5 \pm 0,1$ mmol/L; $p < 0,01$) i K_{6/18} ($6,5 \pm 0,2$ mmol/L; $p < 0,01$) na kraju prve nedelje (Grafikon 4.1.A). Značajno viši nivoi glukoze su takođe primećeni u grupi DM_{6/18} ($20,2 \pm 1,3$ mmol/L) u poređenju sa grupama K_{12/12} i K_{6/18} ($p < 0,01$). Nije bilo značajne razlike između grupa DM_{6/18} i DM_{12/12} ($p > 0,05$; Grafikon 4.1.A). Telesna masa na kraju prve nedelje bila je značajno niža u grupama DM_{12/12} ($221,11 \pm 13,53$ g) i DM_{6/18} ($221,60 \pm 12,61$ g) u poređenju sa grupama K_{12/12} ($244,00 \pm 14,33$ g) i K_{6/18} ($249,87 \pm 15,87$ g) ($p < 0,05$; Grafikon 4.1.B). Nije primećena značajna razlika između grupa K_{12/12} i K_{6/18} ($p > 0,05$; Grafikon 4.1.B). Isti trendovi su primećeni na kraju druge i treće nedelje u nivoima glukoze u krvi ($p < 0,01$; Grafikon 4.1.A) i telesnoj masi ($p < 0,05$; Grafikon 4.1.B).

Koncentracija melatonina u serumu tri nedelje nakon administracije STZ-a bila je značajno viša u grupama K_{6/18} ($3,24 \pm 0,36$ ng/mL) i DM_{6/18} ($3,71 \pm 0,22$ ng/mL) u poređenju sa grupama K_{12/12} ($1,98 \pm 0,26$ ng/mL; $p < 0,01$) i DM_{12/12} ($2,02 \pm 0,22$ ng/mL; $p < 0,01$; Grafikon 4.1.C).



Grafikon 4.1. Nivo glukoze u krvi, telesna masa i nivou melatonina u serumu eksperimentalnih životinja

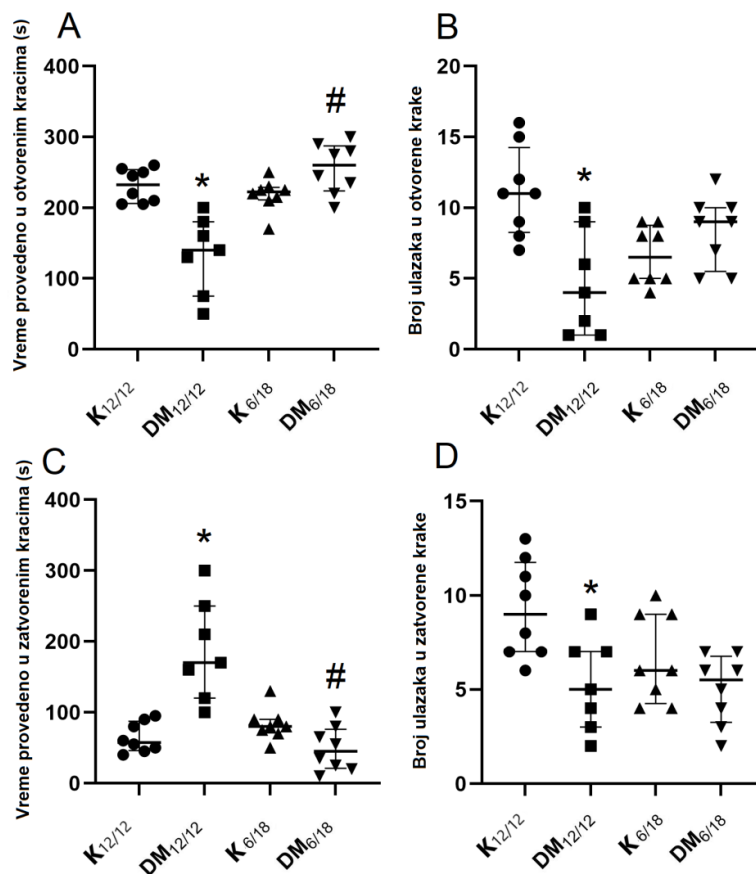
(A) Nivo glukoze u krvi, (B) telesna masa i (C) nivo melatonina u serumu kod eksperimentalnih životinja. Dijabetes je indukovano jednom intraperitonealnom dozom streptozotocina (STZ, 100 mg/kg). Životinje su zatim bile izložene ciklusu svetlo/tama od 6/18 h tokom 3 nedelje (grupe K_{6/18} i DM_{6/18}) ili redovnom ciklusu svetlo/tama od 12/12 h (grupe K_{12/12} i DM_{12/12}). Glukoza je merena u uzorcima krvi dobijenim iz repne vena svake nedelje tokom 3 nedelje nakon administracije STZ-a. Melatonin je određen u uzorcima seruma dobijenim iz krvi 3 nedelje nakon administracije STZ-a, a nakon

završenih bihevioralnih testova. Statistička značajnost je procenjena analizom varijanse (ANOVA) sa Dunnettovim post hoc testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa $K_{12/12}$, ## $p < 0,01$ u poređenju sa $DM_{12/12}$). Skraćenice: $DM_{12/12}$, dijabetička grupa izložena ciklusu svetlo/tama od 12/12 h; $K_{6/18}$, grupa izložena ciklusu svetlo/tama od 6/18 h; $DM_{6/18}$, dijabetička grupa izložena ciklusu svetlo/tama od 6/18 h.

4.2. Bihevioralni testovi

4.2.1. Test uzdignutog krstastog lavirinta

Anksiozno ponašanje u testu uzdignutog krstastog lavirinta povezano je sa smanjenim vremenom provedenim na otvorenim kracima i smanjenim brojem ulazaka u otvorene krake. Vreme provedeno na otvorenim kracima i broj ulazaka u otvorene krake bili su značajno smanjeni u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.2.A i B). Međutim, vreme provedeno na otvorenim kracima bilo je značajno povećano u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.2.A). Vreme provedeno na otvorenim kracima i broj ulazaka u otvorene krake nisu se značajno razlikovali između grupa $DM_{6/18}$ i $K_{12/12}$ ($p > 0,05$; Grafikon 4.2.A i B), što ukazuje na anksiolitički efekat skraćenog dnevnog fotoperioda. Anksiolitički efekat je dodatno potvrđen analizom vremena provedenog na zatvorenim kracima. Suprotno tome, vreme provedeno na zatvorenim kracima bilo je značajno duže u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.2.C), i značajno smanjeno u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.2.C). Pored toga, skraćeni dnevni fotoperiod nije uticao na broj ulazaka u zatvorene krake kod dijabetičnih životinja, dok je on bio značajno manji u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.2.D).



Grafikon 4.2. Efekat skraćenog dnevnog fotoperioda na parametre uzdignutog krstastog lavirinta

Test uzdignutog krstastog lavirinta se sastoji od dva otvorena i dva zatvorena kraka (50x10 cm), zatvorena zidovima visokim 30 cm koji su spojeni centralnom platformom. Pacovi su postavljeni na centralnu platformu sa glavom orijentisanom ka zatvorenom kraku i omogućeno im je da istražuju lavirint 5 minuta. Parametri analizirani u ovom testu su:

(A) vreme provedeno na otvorenim kracima,

(B) broj ulazaka u otvorene krake,

(C) vreme provedeno na zatvorenim kracima,

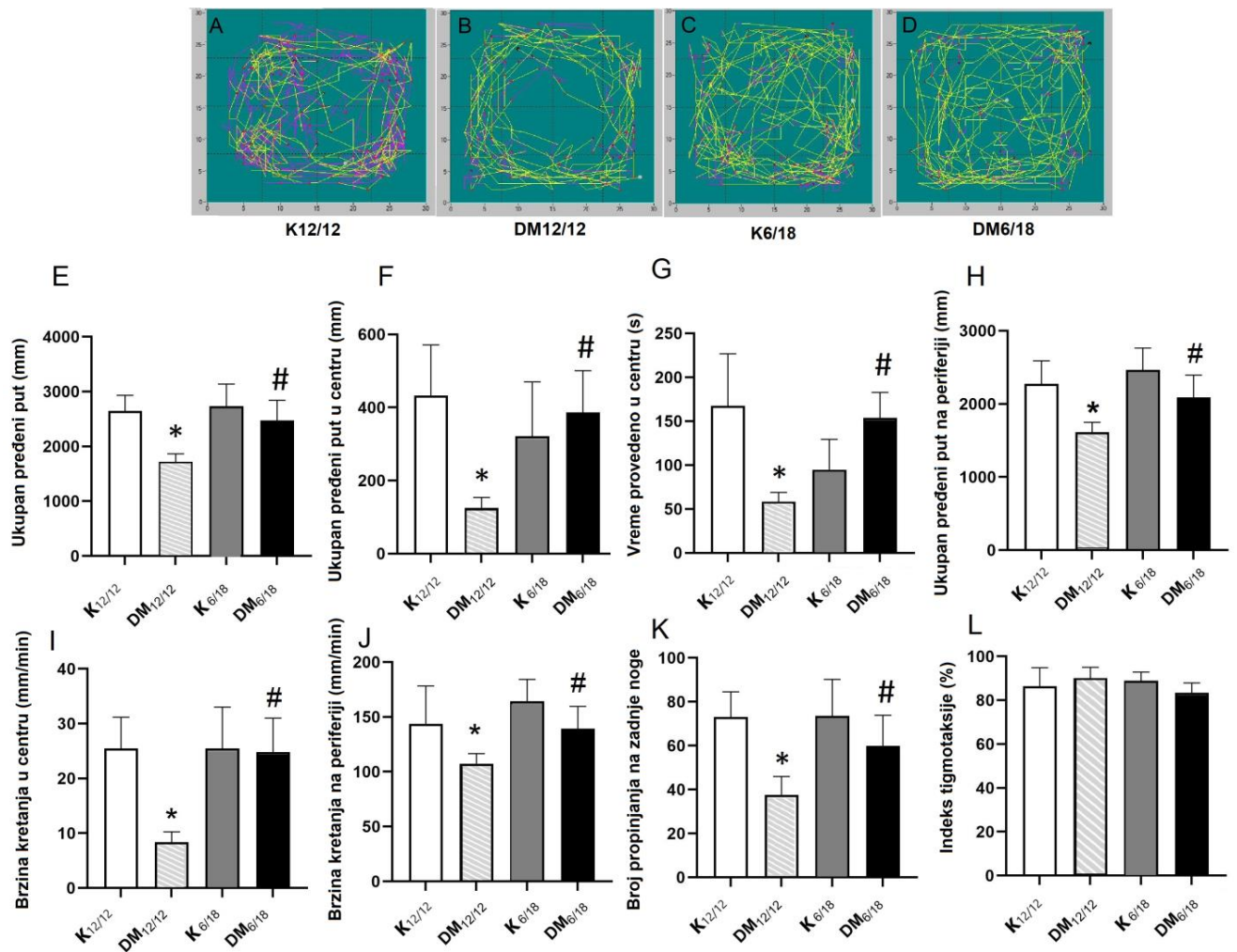
(D) broj ulazaka u zatvorene krake.

Anksiozno ponašanje je povezano sa smanjenim vremenom provedenim na otvorenim kracima, povećanim vremenom provedenim na zatvorenim kracima, smanjenim brojem ukupnih prelaza sa povećanim brojem ulazaka u zatvorene krake. Značaj razlike je procenjen Kruskall-Wallis testom sa Dunnettovim post hoc testom ($p < 0,05$ u poređenju sa $K_{12/12}$, # $p < 0,05$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom). ● ■ ▲ ▼ predstavljaju pojedinačne vrednosti u $K_{12/12}$, $DM_{12/12}$, $K_{6/18}$ i $DM_{6/18}$ grupi, redom.*

4.2.2. Test otvorenog polja

Anksiozno ponašanje u testu otvorenog polja povezano je sa povećanim vremenom i ukupnim pređenim putem u perifernim poljima test kutije. Reprezentativne slike kretanja pacova prikazane su na Grafikonu 4.3.A-D. Ukupan pređeni put i ukupan pređeni put u centrulisu značajno niži u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.E i F). Međutim, u grupi $DM_{6/18}$, ovi parametri su bili značajno povećani u poređenju sa DM grupom ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.E i F). Slično tome, vreme provedeno u centru polja i broj propinjanja na zadnje noge bili su značajno niži u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.G i K), dok su oba parametra bila značajno viša u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.G i K). Ovi podaci sugerišu da, prema parametrima testa otvorenog polja, DM izaziva anksiozno ponašanje, dok skraćenje fotoperioda ima anksiolitički efekat.

Ukupan pređeni put u perifernim zonama i brzina kretanja na periferijibili su značajno niži u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$, Grafikon 4.3.H i J). S druge strane, ovi parametri su bili značajno viši u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.H i J). Isti trend između grupa je primećen kada je analizirana brzina kretanja u centralnim poljima. Dok je brzina kretanja u centralnom polju bila značajno niža u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.I), značajno više vrednosti primećene su u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.3.I). Ovi rezultati ukazuju na to da DM smanjuje istraživačko ponašanje pacova u testu uzdignuto krstastog lavirinta, dok skraćeni fotoperiod preokreće ovaj efekat. S druge strane, nije bilo značajne razlike u vezi sa indeksom tigmoksije između posmatranih grupa ($p > 0,05$; Grafikon 4.3.L).



Grafikon 4.3. Efekat skraćenog dnevnog fotoperioda na ponašanje u otvorenom polju

Horizontalna i vertikalna motorna aktivnost životinja registrovana je tokom 15 minuta u prostoru sa smanjenom bukom sa 12 luksa crvenog osvetljenja, okruženom crnim zidovima visokim 40 cm. Celokupan prostor je podeljen na 16 imaginarnih kvadrata sa 4 srednja kvadrata označena kao centralna oblast. Reprerzentativne slike kretanja životinja prikazane su na Figuri 4.3.A-D.

Parametri dobijeni u ovom testu uključuju:

(E) Ukupan pređeni put,

(F) Ukupan pređeni put u centru,

(G) Vreme provedeno u centru polja,

(H) Ukupan pređeni put na periferiji,

(I) Brzina kretanja u centru,

(J) Brzina kretanja na periferiji,

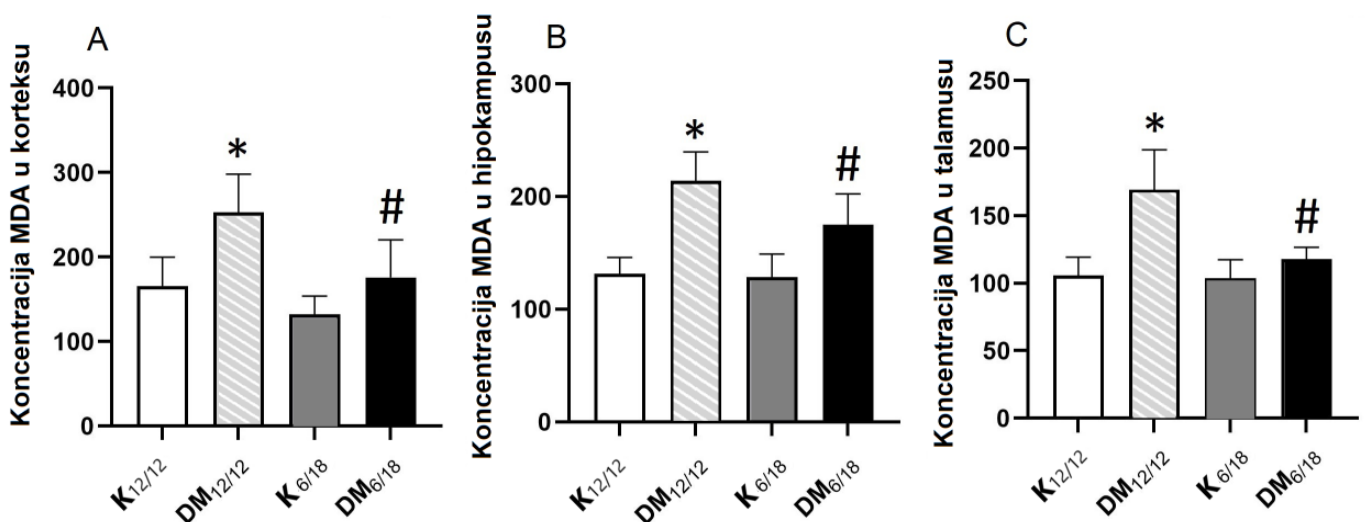
(K) Broj propinjanja na zadnje noge,

(L) Indeks tigmotaksije, definisan kao odnos između pređenog puta u perifernim zonama i ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja.

Anksioznost je obrnuto proporcionalna vremenu provedenom u centralnom delu i direktno proporcionalna indeksu tigmoksije. Značaj razlike je procenjen analizom varijanse (ANOVA) sa Dunnetovim post hoc testom (* $p < 0,05$ u poređenju sa $K_{12/12}$, # $p < 0,05$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom).

4.3. Oksidativni stres

Koncentracija MDA, markera lipidne peroksidacije, u korteksu bila je značajno viša kod pacova u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.4.A). S druge strane, nivo MDA u korteksu bio je značajno niži u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.4.A). Slično korteksu, koncentracija MDA u hipokampusu i talamusu bila je značajno viša u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.4.B i C), međutim, bila je značajno niža u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.4.B i C). Ovi rezultati jasno ukazuju na to da skraćeni fotoperiod smanjuje lipidnu peroksidaciju u mozgu dijabetičnih pacova.

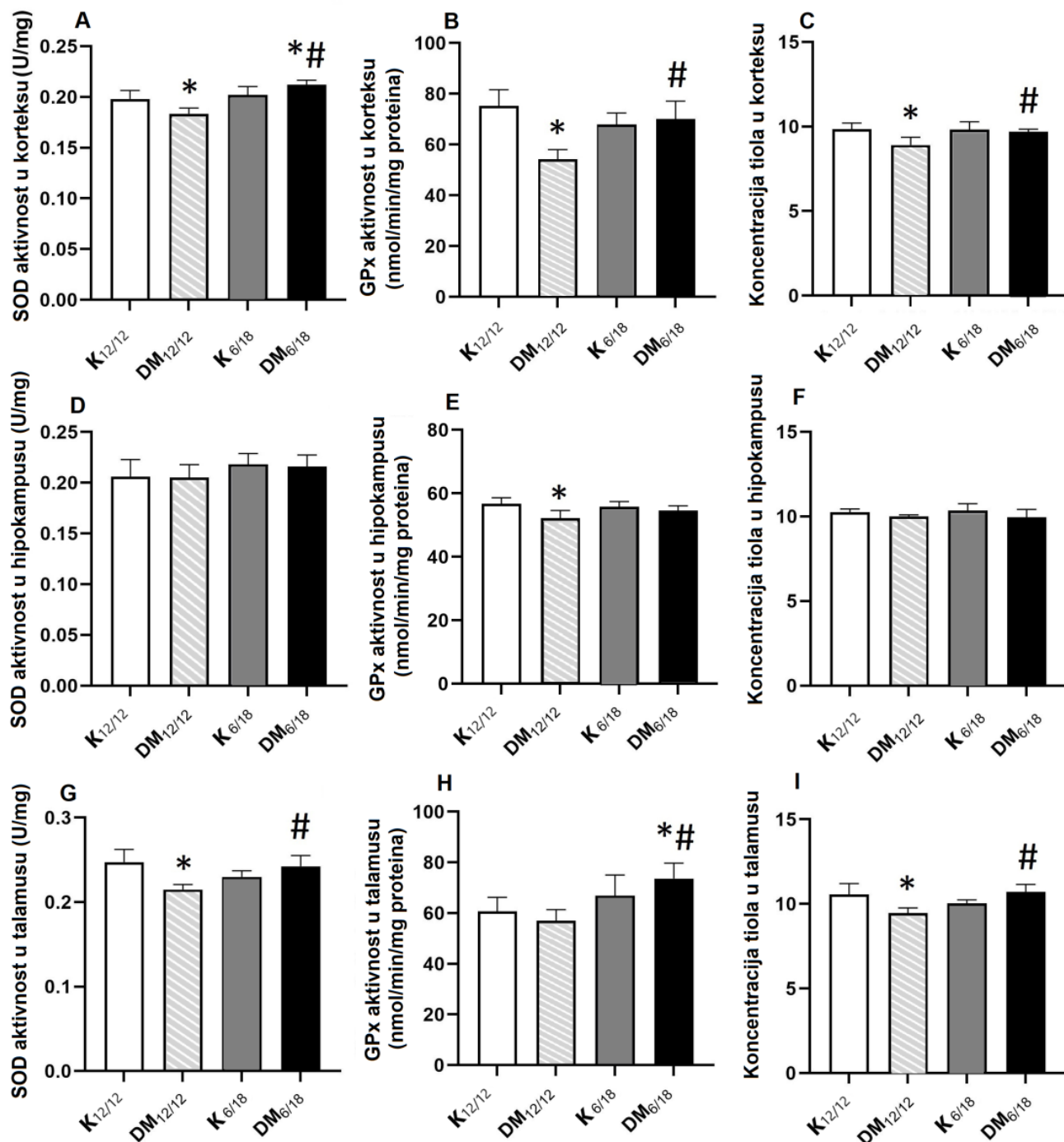


Grafikon 4.4. Efekat skraćenog dnevnog fotoperioda na nivo malondialdehida (MDA) u (A) korteksu, (B) hipokampusu i (C) talamusu

Značaj razlike je procenjen analizom varijanse (ANOVA) sa Dunnetovim post hoc testom (* $p < 0,05$ u poređenju sa $K_{12/12}$, # $p < 0,05$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom).

Aktivnosti antioksidativnih enzima i P-SH kao indikatora redoks stanja prikazani su na Grafikonu 4.5. Aktivnosti SOD-a, GPx-a i nivo P-SH u korteksu bili su značajno niži u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.5.A, B i C). Međutim, skraćeni fotoperiod je preokrenuo ove promene i svi prethodni parametri su bili značajno viši u grupi $DM_{6/18}$ u poređenju sa grupom $DM_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.5.A, B i C). Aktivnost SOD-a u korteksu bila je čak značajno viša u grupi $DM_{6/18}$ ($0,21 \pm 0,01$) u poređenju sa $K_{12/12}$ ($0,19 \pm 0,01$, $p < 0,05$; Grafikon 4.5.A, B i C). S druge strane, nije bilo značajnih razlika u aktivnosti SOD-a i koncentraciji P-SH u hipokampusu između kontrolnih i eksperimentalnih grupa ($p > 0,05$; Grafikon 4.5.D i F). Samo je aktivnost GPx-a u hipokampusu bila značajno niža u grupi $DM_{12/12}$ ($52,14 \pm 2,34$) u poređenju sa grupom $K_{12/12}$ ($56,57 \pm 1,84$, $p < 0,05$; Grafikon 4.5.E), bez značajnih promena između grupa $DM_{6/18}$ ($54,51 \pm 1,55$) i $DM_{12/12}$ ($p > 0,05$; Grafikon 4.5.E). U talamusu, aktivnost SOD-a i koncentracija P-SH bile su značajno smanjene u grupi $DM_{12/12}$ u poređenju sa $K_{12/12}$ ($p < 0,05$; Grafikon 4.5.G i I). Ove promene su

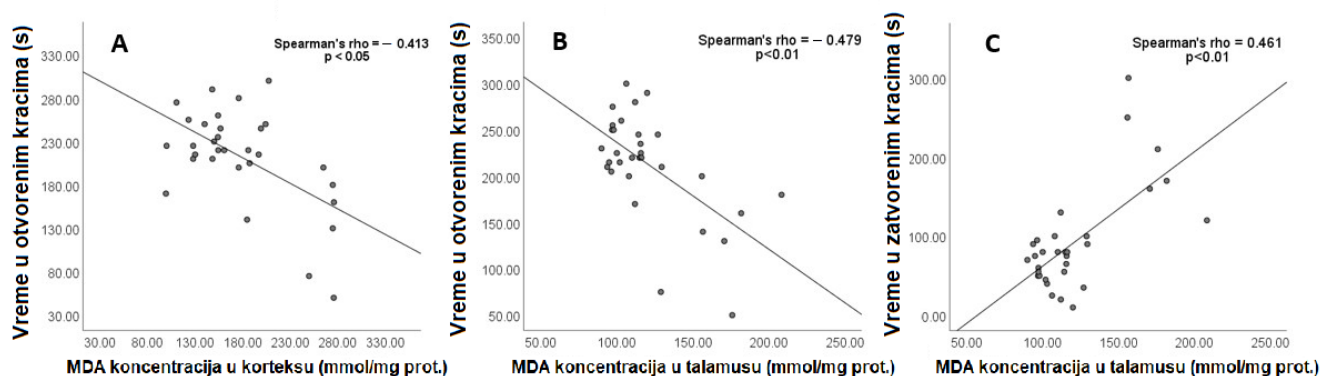
bile preokrenute skraćenim fotoperiodom, tako da su aktivnost SOD-a i koncentracija P-SH bile povećane u grupi DM_{6/18} u poređenju sa grupom DM_{12/12} ($p < 0,05$). Zanimljivo je da, iako aktivnost GPx-a nije bila različita između grupa DM_{12/12} (56.86 ± 3.89) i K_{12/12} (61.12 ± 4.36 ; $p > 0,05$), aktivnost ovog enzima u talamusu bila je značajno viša u grupi DM_{6/18} (73.12 ± 4.94) u poređenju sa grupom K_{12/12} ($p > 0,05$) i DM_{12/12} ($p > 0,05$; Grafikon 4.5.H).



Grafikon 4.5. Aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) (A-C), glutation peroksidaze (GPx) (D-F) i koncentracija tiolnih grupa (G-I) u korteksu, hipokampusu i talamusu dijabetičnih pacova izloženih skraćenom dnevnom fotoperiodu i redovnom ciklusu svetlo/tama

Značaj razlike je procenjen analizom varijanse (ANOVA) sa Dunnetovim post hoc testom ($*p < 0,05$ u poređenju sa $K_{12/12}$, $\#p < 0,05$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom).

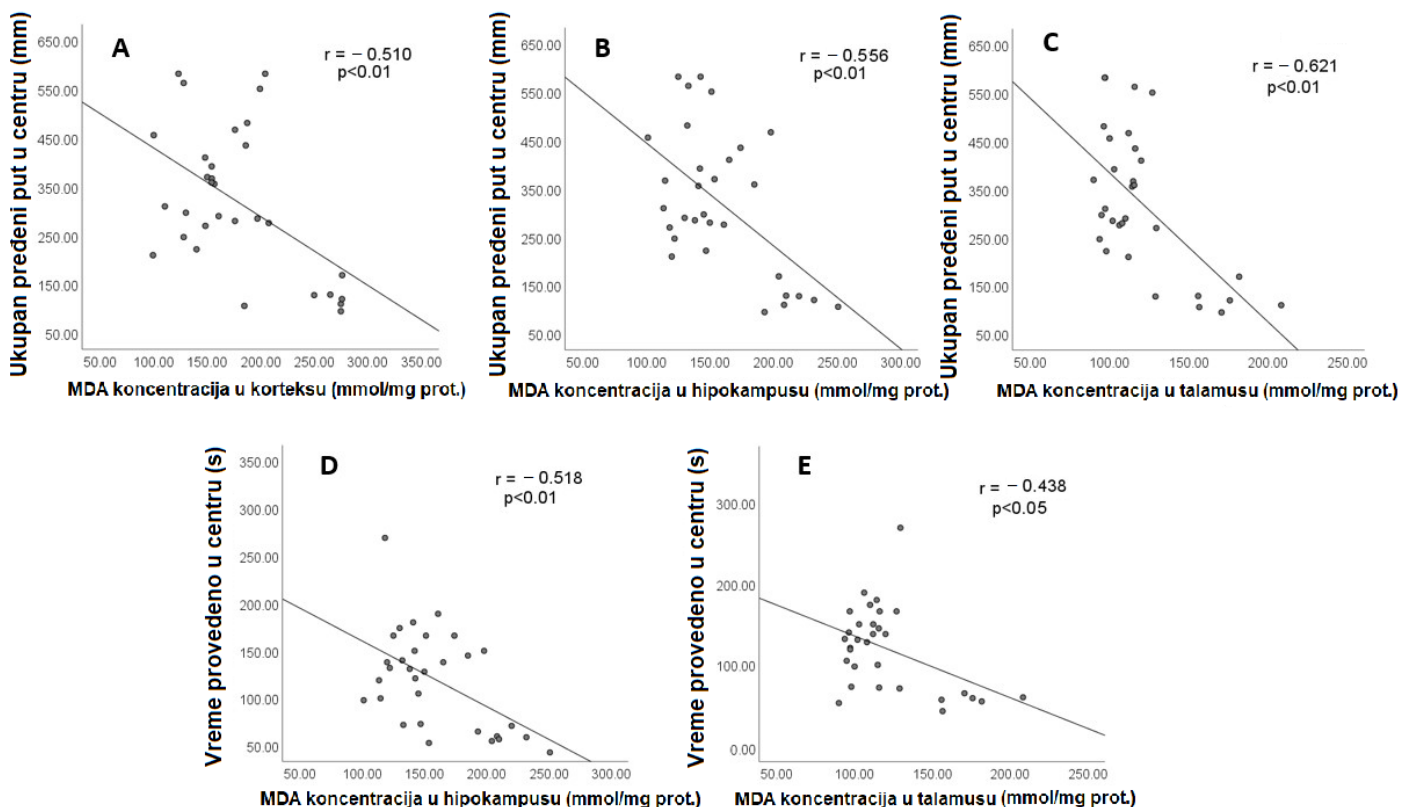
Pronađena je značajna negativna korelacija između vremena provedenog u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta i koncentracije MDA u korteksu (Spearman $\rho = -0,413$, $p < 0,05$; Grafikon 4.6.A) i talamusu (Spearman $\rho = -0,479$, $p < 0,01$; Grafikon 4.6.B), dok nije bilo značajne korelacije između vremena provedenog u otvorenim kracima i nivoa MDA u hipokampusu (Spearman $\rho = -0,417$, $p > 0,05$). S druge strane, pozitivna korelacija između vremena provedenog u zatvorenim kracima i nivoa MDA pronađena je samo u talamusu (Spearman $\rho = 0,461$, $p < 0,01$; Grafikon 4.6.C).



Grafikon 4.6. Korelacija između MDA u moždanim strukturama i anksioznog ponašanja analizirana je korišćenjem Spearmanovog testa.

Korelacija se smatrala značajnom ako je $p < 0,05$.

Pronađena je značajna negativna korelacija između ukupnog pređenog puta u centru u testu otvorenog polja i koncentracije MDA u korteksu ($r = -0,510$, $p < 0,01$; Grafikon 4.7.A), hipokampusu ($r = -0,556$, $p < 0,01$; Grafikon 4.7.B) i talamusu ($r = -0,621$, $p < 0,01$; Grafikon 4.7.C). Slično tome, vreme provedeno u centru polja takođe značajno negativno korelira sa nivoom MDA u hipokampusu ($r = -0,518$, $p < 0,01$; Grafikon 4.7.D) i talamusu ($r = -0,438$, $p < 0,05$; Grafikon 4.7.E).



Grafikon 4.7. Korelacija između MDA u moždanim strukturama i anksioznog ponašanja analizirana je korišćenjem Pearsonovog testa

Korelacija se smatrala značajnom ako je $p < 0,05$.

Ovi podaci zajednički ukazuju na to da antioksidativni efekat skraćenog dnevnog fotoperioda korelira sa njegovim anksiolitičkim efektom kod dijabetičnih pacova.

4.4. Status lipida i koncentracija metil estara masnih kiselina

Iako su ukupni serumski holesterol i HDL imali tendenciju promena kod dijabetičnih pacova, nisu uočene značajne promene u ovim parametrima u grupi DM_{12/12} u poređenju sa K_{12/12} ($p > 0,05$). Međutim, HDL holesterol je bio značajno viši u grupama DM_{6/18} i DM_{12/12} u poređenju sa K_{12/12} ($p < 0,01$). Koncentracija triglicerida bila je značajno viša u grupi DM_{12/12} u poređenju sa K_{12/12} ($p < 0,01$) i niža u grupi DM_{6/18} u poređenju sa grupom DM_{12/12} ($p < 0,01$; Tabela 4.1.).

U grupi DM_{12/12} koncentracija vakkenske kiseline (C18:1 ω 7) u serumskim lipidima bila je značajno niža u poređenju sa K_{12/12} ($p < 0,01$). S druge strane, u grupi DM_{6/18} koncentracije oleinske (C18:1 ω 9), vakkenske (C18:1 ω 7), dihomog γ -linolenske (C20:3) i DHA (C22:6) kiseline bile su značajno više u poređenju sa grupom DM_{12/12}. Nisu uočene značajne promene u koncentraciji palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0), palmitoleinske (C16:1), γ -linolenske (C18:3 ω 6), linolelaidične (C18:2), arahidonske (C20:4), dokosatetraenoiinske (C22:4), α -linolenske (C18:3 ω 3), EPA (C20:5) i DPA (C22:5) kiseline ($p > 0,05$; Tabela 4.1.).

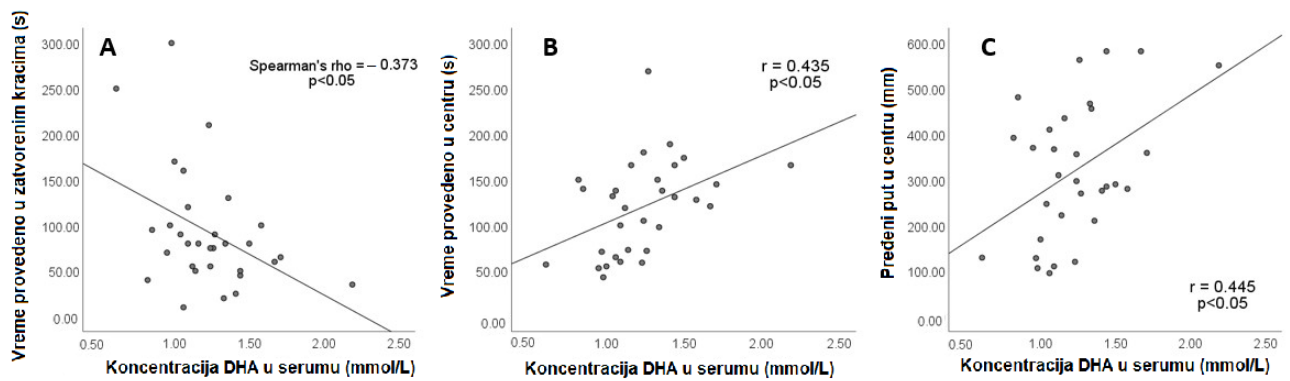
Tabela 4.1. Status lipida i koncentracija metil estara masnih kiselina u serumu pacova izloženih skraćenom dnevnom fotoperiodu i redovnom ciklusu svetlo/tama.

Parametar[mmol/L]	K _{12/12}	DM	K _{6/18}	DM _{6/18}
Ukupan holesterol	1.04±0.09	1.06±0.06	1.08±0.08	1.11±0.10
TRG	0.65±0.14	0.87±0.17**	0.66±0.08	0.58±0.12 ^{##}
HDL	0.52±0.05	0.45±0.04	0.46±0.03	0.63±0.09** ^{##}
C16:0	23.65±1.55	22.83±3.82	23.96±2.91	23.62±2.28
C18:0	12.36±2.29	12.95±1.41	11.76±1.95	11.18±2.05
C16:1	0.42±0.06	0.42±0.62	0.54±0.09	0.53±0.12
C18:1ω9	9.55±2.74	8.34±0.85	10.78±1.41	12.16±3.97 [#]
C18:1ω7	2.04±0.26	1.05±0.27**	1.81±0.31	1.93±0.62 ^{##}
C18:2	28.97±2.36	28.77±4.07	26.57±3.71	28.32±3.07
C18:3ω6	0.12±0.04	0.25±0.12	0.15±0.03	0.24±0.18
C20:3	0.50±0.08	0.44±0.04	0.62±0.17	0.66±0.16 ^{##}
C20:4	19.66±2.07	19.87±2.15	19.99±2.73	20.68±3.73
C22:4	0.43±0.08	0.42±0.07	0.39±0.05	0.54±0.15
C18:3ω3	0.32±0.14	0.32±0.11	0.28±0.04	0.29±0.08
C20:5	0.06±0.03	0.09±0.02	0.08±0.05	0.07±0.03
C22:5	0.45±0.16	0.37±0.07	0.35±0.05	0.45±0.13
C22:6	1.27±0.31	0.99±0.19	1.18±0.15	1.45±0.38 ^{##}

Sve vrednosti su izražene kao srednje vrednosti ± SD. Značaj razlike procenjen je analizom varijanse (ANOVA) sa Dunnetovim post hoc testom (*p<0,05 u poređenju sa K_{12/12}, #p<0,05 u poređenju sa DM_{12/12}).

Skraćenice: TRG, trigliceridi; HDL, lipoproteini visoke gustine; C16:0, palmitinska kiselina; C18:0, stearinska kiselina; C16:1, palmitoleinska kiselina; C18:1ω9, oleinska kiselina; C18:1ω7, vakcenska kiselina; C18:2, linolelaidična kiselina; C18:3ω6, γ-linolenska kiselina; C20:3, dihomo-γ-linolenska kiselina; C20:4, arahidonska kiselina; C22:4, dokosatetraenoinska kiselina; C18:3ω3, α-linolenska kiselina; C20:5, eikosapentaenoinska kiselina; C22:5, dokosapentaenoinska kiselina; C22:6, dokozaheksaenoinska kiselina.

Analiza korelacije između nivoa DHA i parametara anksioznosti prikazana je na Grafikonu 4.8. Koncentracija DHA u serumu negativno korelira sa vremenom provedenim na zatvorenim kracima testa uzdignutog krstastog lavirinta (Spearman rho=-0.373, p<0,05; Grafikon 4.8.A). S druge strane, koncentracija DHA u serumu pozitivno korelira sa vremenom provedenim u centralnim poljima testa otvorenog polja (r=0.435, p<0,05; Grafikon 4.8.B) i pređenim putem u centru (r=0.445, p<0,05; Grafikon 4.8.C). Nisu pronađene značajne korelacije između koncentracija drugih masnih kiselina u serumu i parametara anksioznosti.

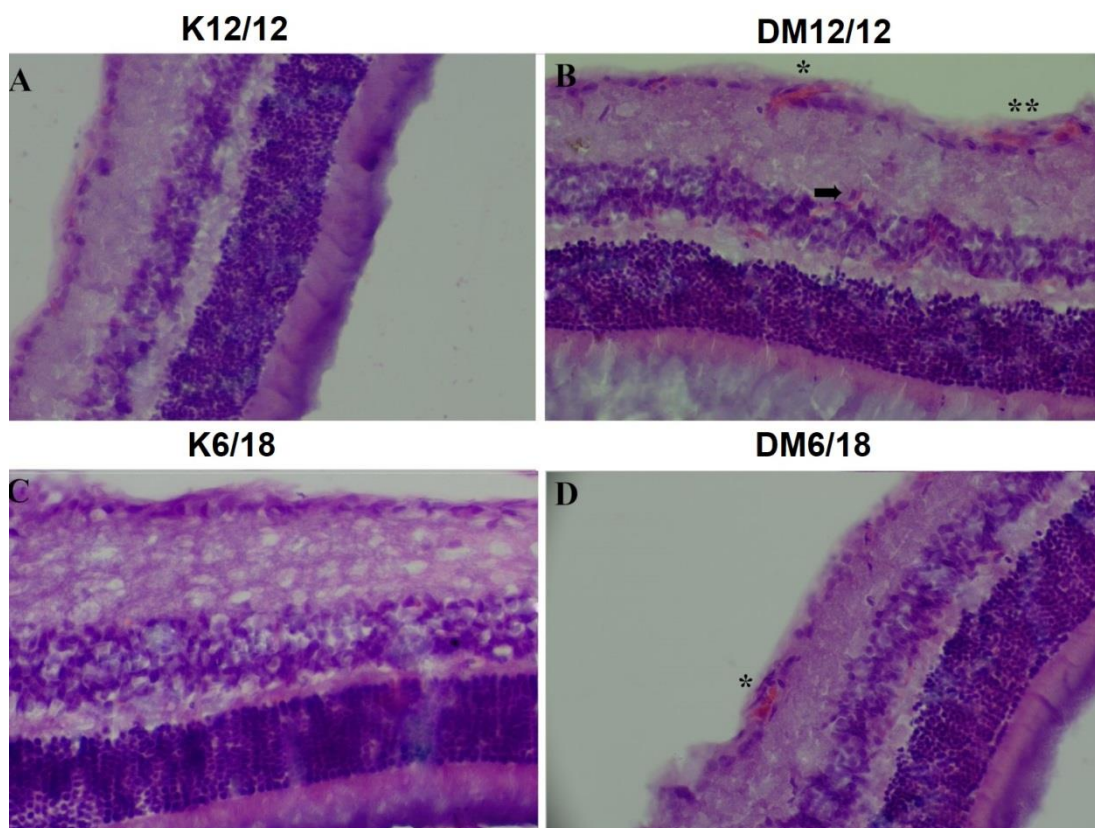


Grafikon 4.8. Korelacija između koncentracija FAME i parametara anksioznosti analizirana je korišćenjem Spearmanovog testa

Korelacija se smatrala značajnom ako je $p < 0,05$.

4.5. Smanjena dnevna izloženost svetlosti ublažava vaskulopatiju u retini pacova tretiranih STZ-om

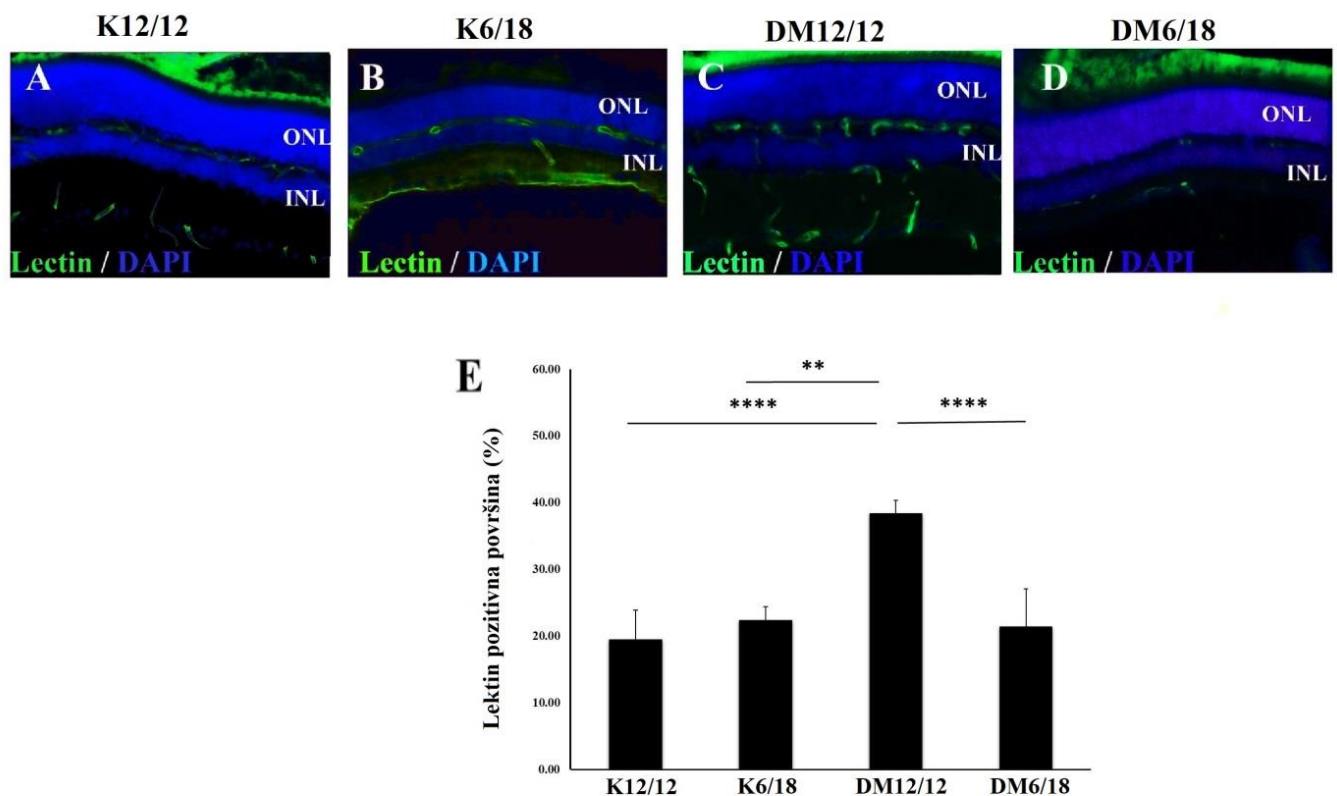
Patološke promene nisu pronađene u retinama $C_{12/12}$ i $C_{6/18}$ grupe (Grafikon 4.9.A i C). Međutim, H&E bojenje je pokazalo da dijabetes u našem modelu izaziva vaskulopatiju koja se manifestuje u formi hemoragija u obliku plamena i mikroaneurizmi (Grafikon 4.9.B). S druge strane, smanjena izloženost svetlosti ublažila je vaskulopatiju smanjenjem broja hemoragija u obliku plamena u $DM_{6/18}$ grupi. Mikroaneurizme nisu bile prisutne u $DM_{6/18}$ grupi (Grafikon 4.9.D).



Grafikon 4.9. Reprezentativno H&E bojenje retine u kontrolnoj (A) i eksperimentalnim grupama (B-D)

Nisu pronađene patološke promene u $K_{12/12}$ grupi (A) (uvećanje $\times 200$) i $K_{6/18}$ grupi (C) (uvećanje $\times 400$). (B) U $DM_{12/12}$ grupi evidentne su hemoragije u obliku plamena u sloju ganglijskih ćelija retine (zvezdica *), kao i dilatacija malih krvnih sudova koja ukazuje na mikroaneurizme (strelica \blacktriangleright). (D) U $DM_{6/18}$ grupi su bile prisutne fokalne hemoragije u obliku plamena (zvezdica *), bez vidljive dilatacije malih krvnih sudova. Skraćenice: $DM_{12/12}$, grupa sa dijabetes melitusom; $K_{6/18}$, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; $DM_{6/18}$, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h.

Efekat smanjene izloženosti svetlosti na vaskularizaciju retine procenjen je korišćenjem lektina (*Lycopersicon esculentum* lektin). Reprezentativne slike lektinskog bojenja prikazane su na Grafikon 4.10.A-D. Imunohistohemijsko bojenje lektinskim antitelom konjugovanim sa hromoforom pokazalo je dvostruko povećanje procenta lektin-pozitivnih krvnih sudova u retinama $DM_{12/12}$ ($41 \pm 4.6\%$) u poređenju sa $K_{12/12}$ ($20.46 \pm 4.4\%$) ($P < 0.001$) i $K_{6/18}$ grupom ($23.45 \pm 0.9\%$) ($p < 0,01$). Nasuprot tome, značajno smanjenje procenta lektin pozitivne površine primećeno je u $DM_{6/18}$ ($12.35 \pm 2.8\%$) u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom ($p < 0,001$).



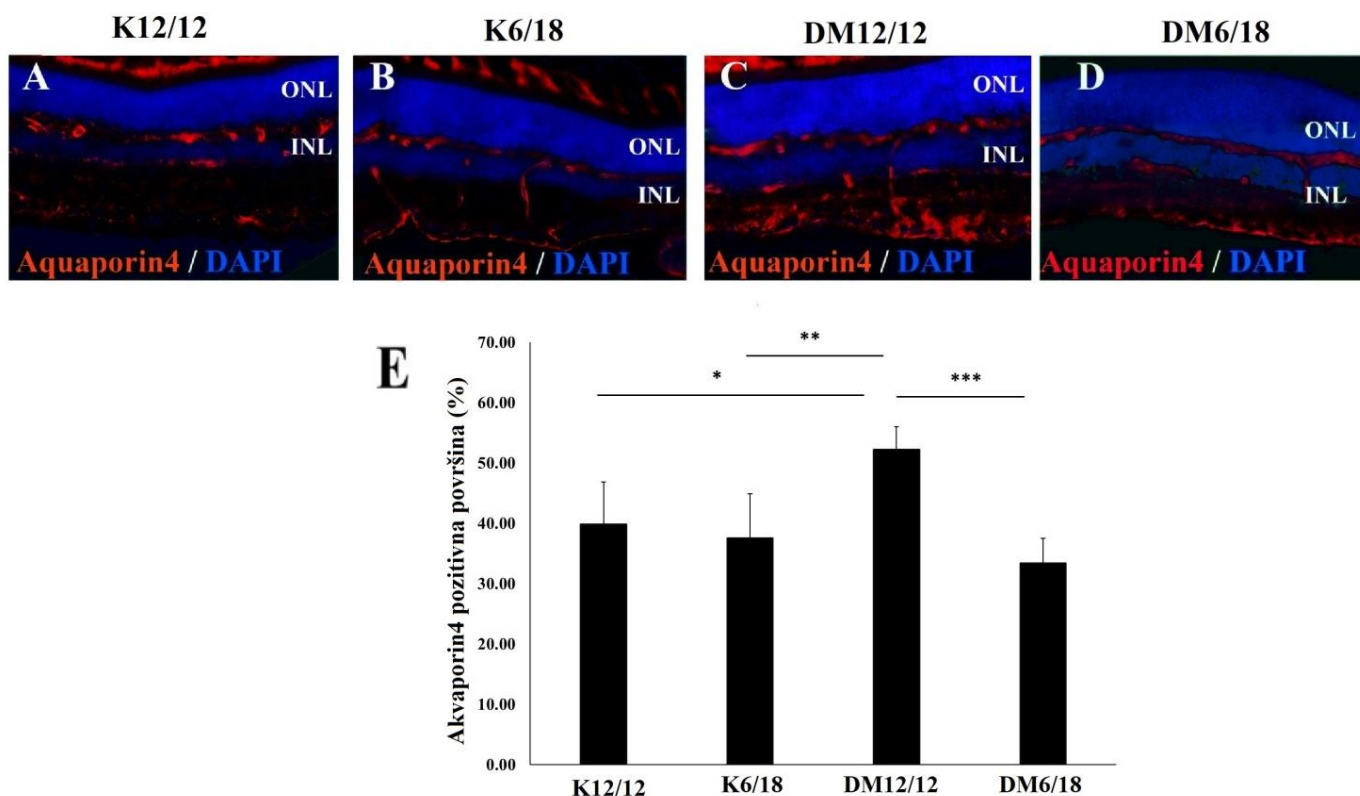
Grafikon 4.10. Reprezentativne imunofluorescentne mikrografije lektinskog bojenja krvnih sudova retine u kontrolnoj (A) i eksperimentalnim grupama (B-D) (uvećanje $\times 20$)

Sekcije su inkubirane sa primarnim antitelom zeca protiv lektina preko noći, a zatim tretirane sekundarnim antitelom konjugovanim sa hromoforom (zelena boja). Nakon ispiranja sa PBST (0.1% Triton u 1x fosfatno-puferovanom rastvoru), preparati su pokriveni DAPI sredstvom za montažu

(plava boja). (E) Kvantifikacija lektin pozitivnih krvnih sudova u unutrašnjem nuklearnom sloju (INL) izračunata je kao procenat ukupne analizirane površine koja je lektin pozitivna. Statistička značajnost razlike procenjena je ANOVA testom sa Dunnetovim post hoc testom (** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$). Skraćenice: DM_{12/12}, grupa sa dijabetes melitusom; K_{6/18}, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; DM_{6/18}, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; ONL, spoljašnji nuklearni sloj.

4.6. Smanjena dnevna izloženost svetlosti smanjuje ekspresiju Aqp4 u retini, ali povećava perivaskularnu ekspresiju Aqp4 kod pacova tretiranih STZ-om

Reprezentativne slike imunobojenja za Aqp4 prikazane su na Grafikonu 4.11.A-D. Ekspresija Aqp4 u retini bila je značajno viša u DM_{12/12} (52.21±3.77%) u poređenju sa K_{12/12} (39.81±7.04%) ($p=0,016$). Slično tome, ekspresija Aqp4 je bila značajno viša u DM_{12/12} u poređenju sa K_{6/18} grupom (37.51±7.35%) ($p=0,002$). Međutim, smanjena izloženost svetlosti izazvala je značajan pad ekspresije Aqp4 u retini DM_{6/18} grupe (33.36±4.16%) u poređenju sa DM_{12/12} grupom ($p=0,001$). Nije bilo značajnih promena u ekspresiji Aqp4 između DM_{6/18} i K_{12/12} ($p=0,603$), kao ni između DM_{6/18} i K_{6/18} grupe ($p>0,999$; Grafikon 4.11.E).

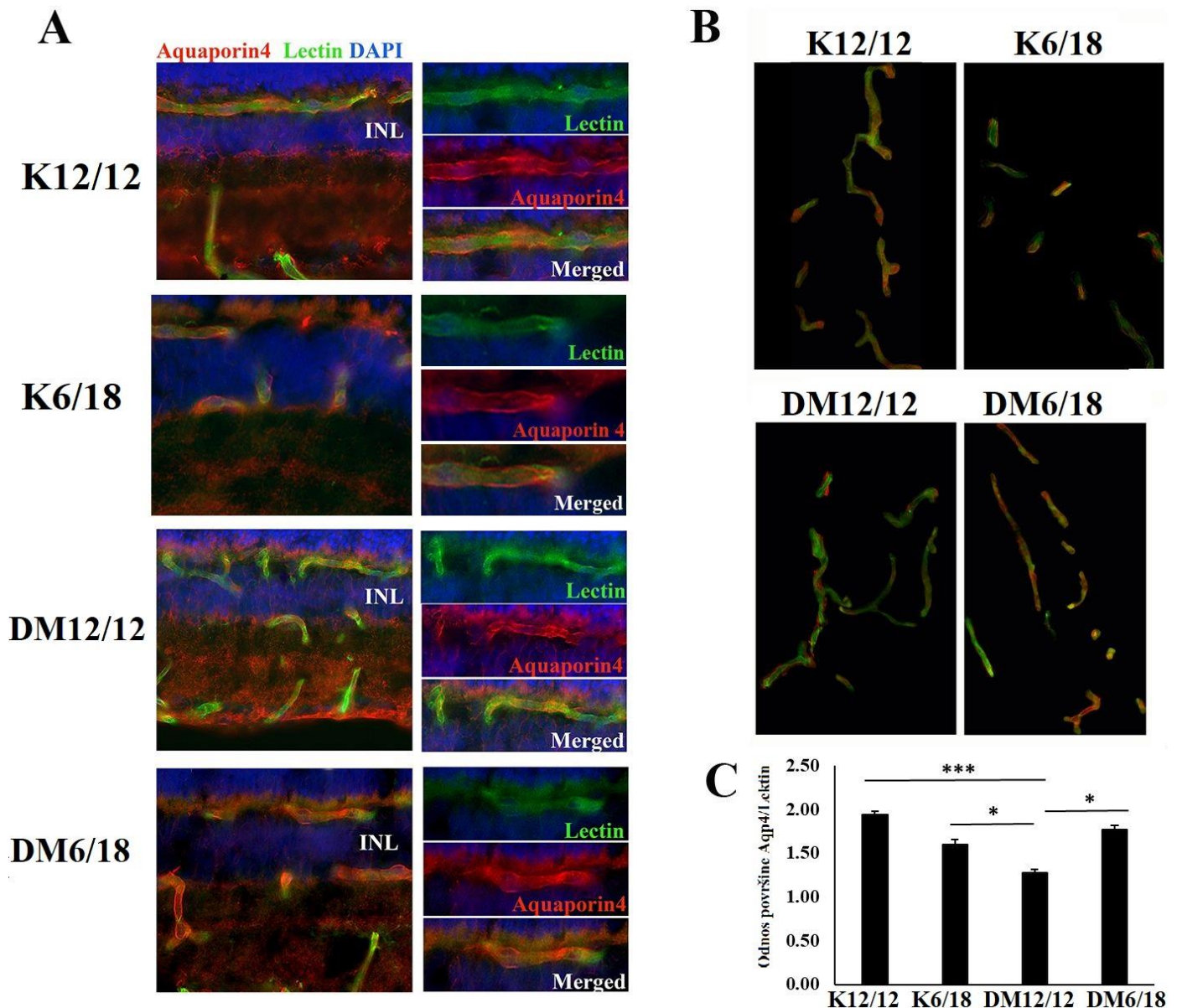


Grafikon 4.11. Reprezentativne imunofluorescentne mikrofotografije bojenja akvaporina-4 (Aqp4) u retini kontrolne (A) i eksperimentalnih grupa (B-D) (uvećanje x20)

Sekcije su inkubirane sa primarnim antitelom zeca protiv Aqp4 preko noći, a zatim tretirane sekundarnim antitelom konjugovanim sa hromoforom (crvena boja). Nakon ispiranja sa PBST (0.1% Triton u 1x fosfatno-puferovanom rastvoru), preparati su pokriveni DAPI sredstvom za montažu (plava boja). (E) Kvantifikacija Aqp4 u unutrašnjem nuklearnom sloju (INL) izračunata je kao procenat ukupne analizirane površine koja je pozitivna na Aqp4. Značaj razlike procenjen je ANOVA testom sa Dunnetovim post hoc testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Skraćenice: DM12/12,

grupa sa dijabetes melitusom; K6/18, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; DM6/18, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; ONL, spoljašnji nuklearni sloj.

Istovremeno bojenje za lektin i Aqp4 je izvedeno radi određivanja perivaskularne ekspresije Aqp4, koja je merena kao Aqp4/lektin odnos (Grafikon 4.12.A). Dok je perivaskularna ekspresija Aqp4 bila značajno niža u DM_{12/12} (1.27 ± 0.04) u poređenju sa K_{12/12} (1.95 ± 0.03) ($p=0,001$) i K_{6/18} grupom (1.60 ± 0.06) ($p=0,039$), ekspresija Aqp4 oko krvnih sudova bila je značajno viša u DM_{6/18} u poređenju sa DM_{12/12} grupom ($p=0,023$; Grafikon 4.12.C).



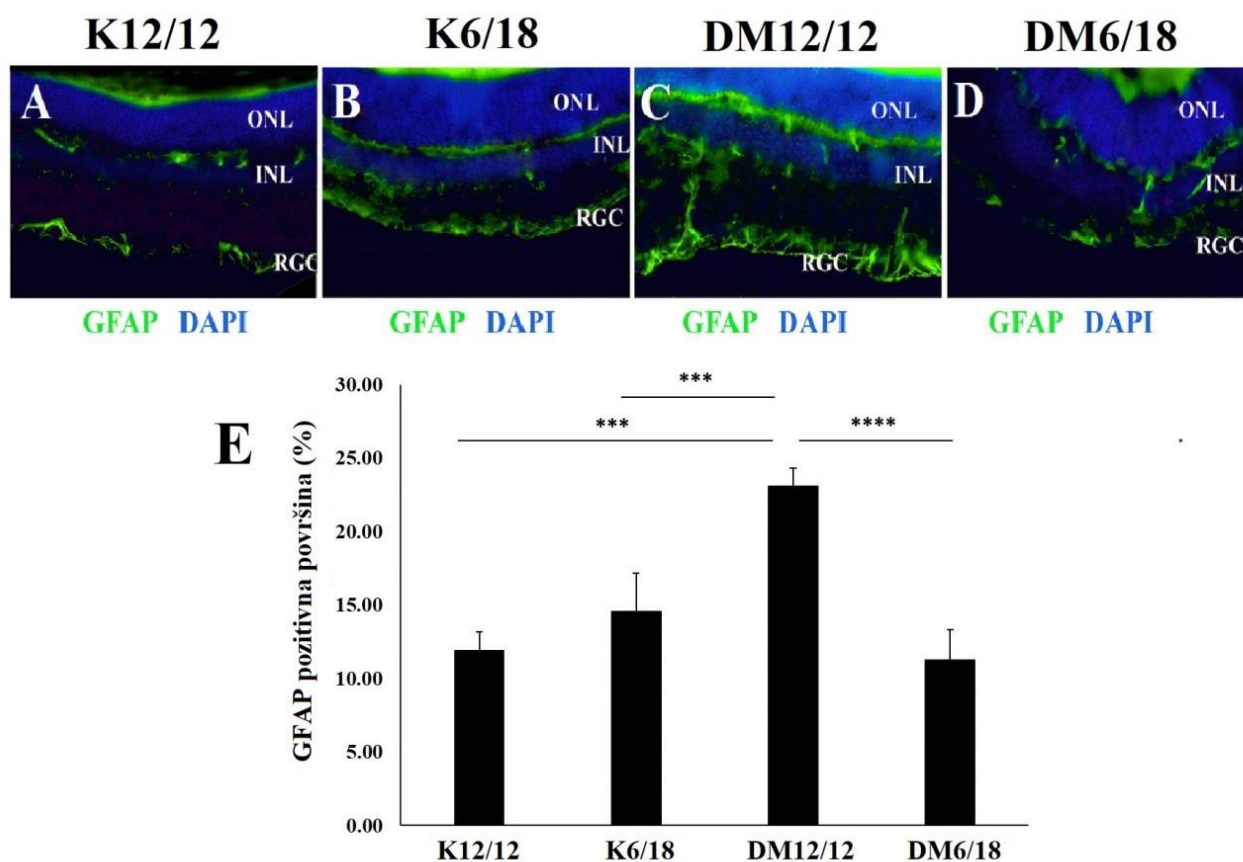
Grafikon 4.12. (A) Reprezentativne slike bojenja akvaporina-4 (Aqp4)/lektina u retini kontrolnih i eksperimentalnih životinja (uvećanje x20)

Sekcije su inkubirane sa primarnim antitelima zeca protiv Aqp4 i lektina preko noći, a zatim tretirane sekundarnim antitelom konjugovanim sa hromoforom. Nakon ispiranja sa PBST (0.1% Triton u 1x fosfatno-puferovanom rastvoru), preparati su pokriveni DAPI sredstvom za montažu (plava boja). Lektin je obojen zelenom bojom, dok je Aqp4 obojen crvenom bojom. (B) Longitudinalni prikaz krvnih sudova u temporalnoj retini nakon bojenja lektinom i Aqp4 (uvećanje x200). (C) Ekspresija Aqp4 u

perivaskularnoj regiji izračunata je kao odnos između bojenja *Aqp4* i lektina. Značaj razlike procenjen je ANOVA testom sa Dunnettovim post hoc testom (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). Skraćenice: *DM*_{12/12}, grupa sa dijabetes melitusom; *K*_{6/18}, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; *DM*_{6/18}, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h.

4.7. Smanjena dnevna izloženost svetlosti smanjuje gliozu i ekspresiju proinflammatoryh citokina IL-1 i TNF- α u retini i RPE pacova

Ekspresija GFAP u retini bila je povećana u *DM*_{12/12} ($23.08 \pm 1.23\%$) u poređenju sa *K*_{12/12} ($15.98 \pm 0.56\%$) ($p < 0,01$), posebno u sloju granularnih ćelija, što ukazuje na prisustvo glioze (Grafikon 4.13.A i C). Međutim, ekspresija GFAP bila je niža u *DM*_{6/18} ($8.12 \pm 0.66\%$) u poređenju sa *DM*_{12/12} grupom ($p < 0,001$) (Grafikon 4.13.D i C).

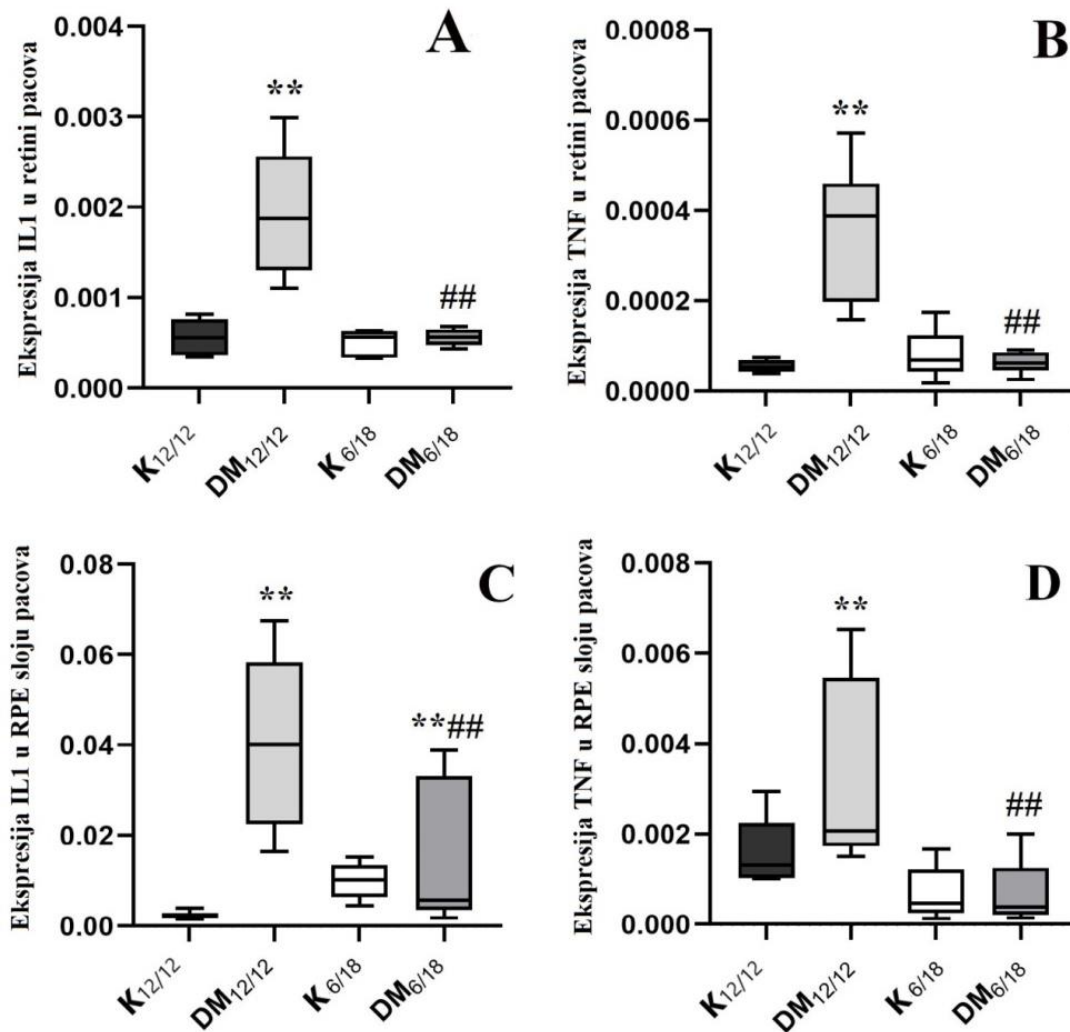


Grafikon 4.13. (A-D) Reprezentativne slike bojenja glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) u unutrašnjem nuklearnom sloju (INL) (uvećanje x20)

(E) Kvantifikacija GFAP u unutrašnjem nuklearnom sloju (INL) izračunata je kao procenat ukupne analizirane površine koja je pozitivna na GFAP. Značaj razlike procenjen je ANOVA testom sa Dunnettovim post hoc testom (*** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$). Skraćenice: ONL, spoljašnji nuklearni sloj; RGC, ganglijske ćelije retine.

Ekspresija gena za interleukin 1 (IL-1) i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) u retini bila je značajno viša u *DM*_{12/12} u poređenju sa *K*_{12/12} grupom ($p = 0,001$). Nasuprot tome, ekspresija *IL-1* i *TNF- α* u retini bila je značajno niža u *DM*_{6/18} u poređenju sa *DM*_{12/12} grupom ($p = 0,001$) i nije se razlikovala u poređenju sa *K*_{12/12} ($p_{IL-1} = 0,834$ i $p_{TNF-\alpha} = 0,345$; Grafikon 4.14.A i B). Slične promene u ekspresiji proinflammatoryh citokina *IL-1* i *TNF- α* bile su

evidentne u RPE. Dok su ekspresije *IL-1* i *TNF- α* u RPE bile značajno više u $DM_{12/12}$ u poređenju sa $K_{12/12}$ grupom ($p_{IL-1}=0,002$ i $p_{TNF-\alpha}=0,005$), ekspresija ovih gena bila je značajno niža u $DM_{6/18}$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom ($p_{IL-1}=0,008$ i $p_{TNF-\alpha}=0,002$; Grafikon 4.14.C i D). Ekspresija gena za citokine nije bila značajno promenjena u $K_{6/18}$ u poređenju sa $K_{12/12}$ grupom ($p_{IL-1}=0,093$ i $p_{TNF-\alpha}=0,401$).

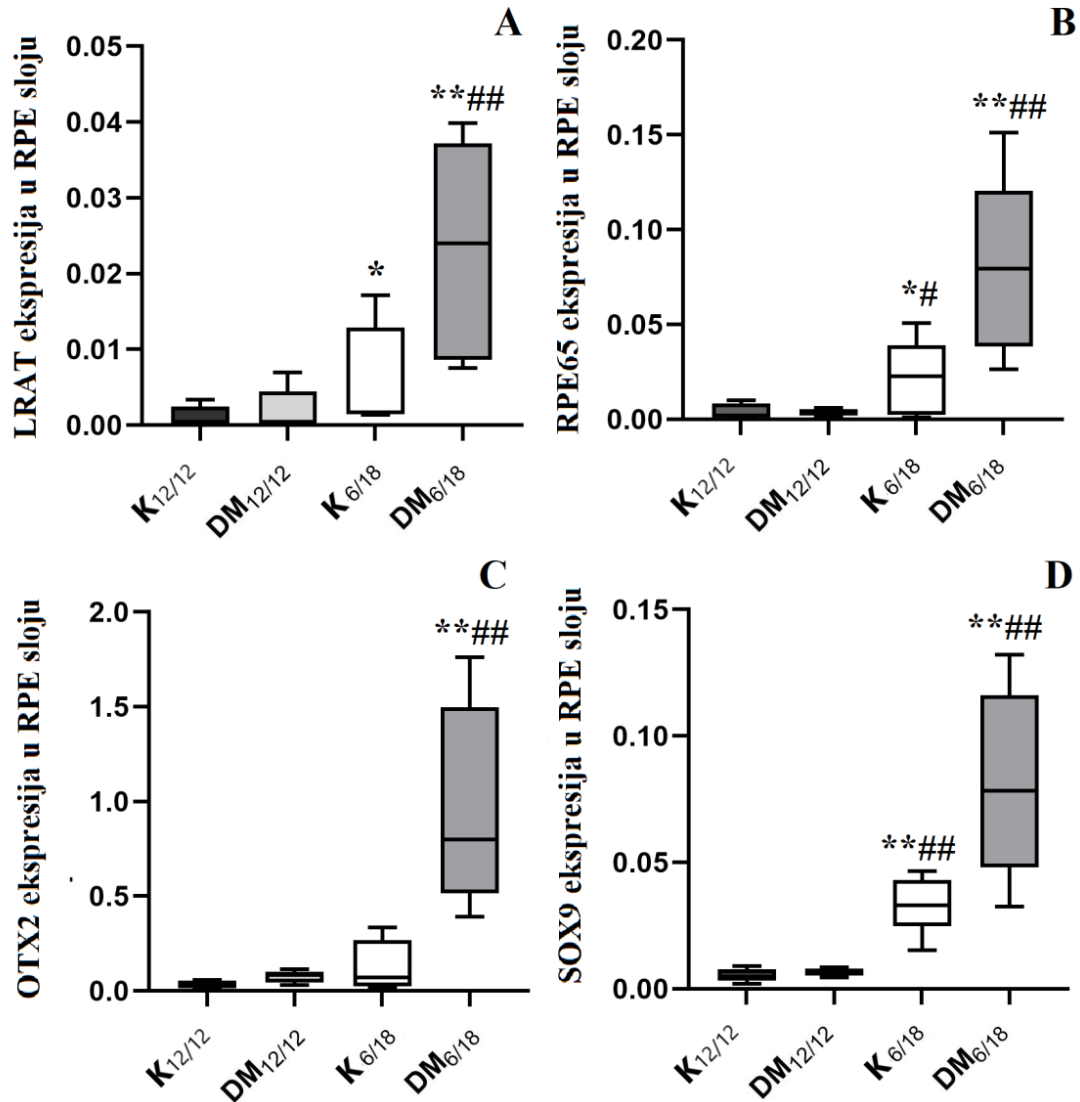


Grafikon 4.14. Efekti smanjene izloženosti svetlosti na ekspresiju gena za interleukin-1 (IL-1) i faktor nekroze tumora α (TNF- α) u retini (A, B) i retinalnom pigmentnom epitelu (RPE) (C, D)

Ekspresija gena određena je metodom real-time kvantitativne lančane reakcije polimeraze (RT-qPCR), a beta aktin je korišćen kao interna kontrola. Značaj razlike procenjen je Kruskal-Wallis testom sa Mann-Whitney post hoc testom (** $p < 0,01$ u poređenju sa $K_{12/12}$, ## $p < 0,01$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom). Skraćenice: $DM_{12/12}$, grupa sa dijabetes melitusom; $K_{6/18}$, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; $DM_{6/18}$, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h.

4.8. Smanjena dnevna izloženost svetlosti ubrzava vizuelni ciklus u RPE sloju i metabolizam holesterola u retini kod pacova tretiranih STZ-om

Nisu uočene značajne promene u ekspresiji vizuelnih gena u RPE sloju u DM_{12/12} grupi u poređenju sa K_{12/12} ($p > 0,05$). S druge strane, ekspresija gena *LRAT*, *OTX2*, *RPE65* i *SOX9* bila je značajno viša u DM_{6/18} grupi u poređenju sa K_{12/12} ($p = 0,001$) i DM_{12/12} grupom ($p = 0,001$; Grafikon 4.15.A-D). Takođe, značajan porast u ekspresiji gena *LRAT*, *RPE65* i *SOX9* bio je prisutan u K_{6/18} grupi u poređenju sa K_{12/12} grupom ($p_{LRAT} = 0,036$, $p_{RPE65} = 0,012$, $p_{SOX9} = 0,001$).

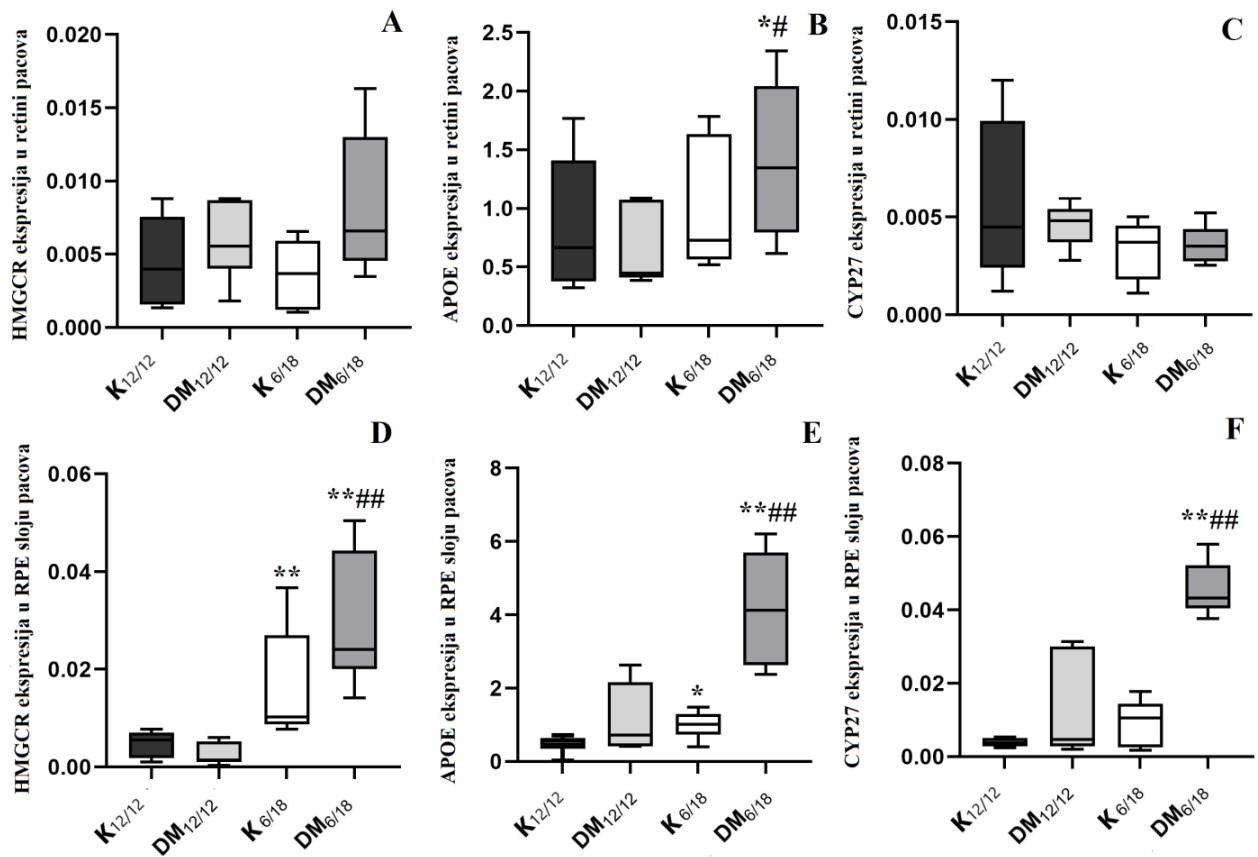


Grafikon 4.15. Efekat smanjene izloženosti svetlosti na ekspresiju gena vizuelnog ciklusa (LRAT, RPE65, SOX9, OTX2) u retinalnom pigmentnom epitelu (RPE)

Značaj razlike procenjen je Kruskal-Wallis testom sa Mann-Whitney post hoc testom (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa K_{12/12}; # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u poređenju sa DM_{12/12} grupom). Skraćenice: DM_{12/12}, grupa sa dijabetes melitusom; K_{6/18}, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; DM_{6/18}, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h.

Ekspresija gena uključenih u metabolizam holesterola u retini nije bila značajno različita u DM_{12/12} grupi u poređenju sa K_{12/12} grupom ($p > 0,05$). Međutim, u DM_{6/18} grupi

samo je ekspresija *APOE* gena u retini bila značajno viša u poređenju sa $K_{12/12}$ ($p=0,046$) i $DM_{12/12}$ grupom ($p=0,021$; Grafikon 4.16.B). Nasuprot retini, u RPE su ekspresije gena *HMGCR*, *APOE* i *CYP27* bile značajno više u $DM_{6/18}$ grupi u poređenju sa $DM_{12/12}$ ($p_{HMGCR}=0,001$, $p_{APOE}=0,003$, $p_{CYP27}=0,001$) i $K_{12/12}$ grupom ($p_{HMGCR}=0,001$, $p_{APOE}=0,001$, $p_{CYP27}=0,001$; Grafikon 4.16.D, E i F). Slično retini, nisu pronađene značajne razlike u ekspresiji gena za metabolizam holesterola u RPE između $DM_{12/12}$ i $K_{12/12}$ grupe ($p>0,05$). Međutim, smanjena izloženost svetlosti sama po sebi izazvala je značajan porast u ekspresiji gena *HMGCR* i *APOE* u $K_{6/18}$ grupi u poređenju sa $K_{12/12}$ ($p_{HMGCR}=0,001$, $p_{APOE}=0,012$).



Grafikon 4.16. Efekat smanjene izloženosti svetlosti na ekspresiju gena za metabolizam holesterola (*HMGCR*, *APOE*, *CYP27*) u retini (A-C) i retinalnom pigmentnom epitelu (RPE) (D-F)

Značaj razlike procenjen je Kruskal-Wallis testom sa Mann-Whitney post hoc testom (* $p<0,05$ i ** $p<0,01$ u poređenju sa $K_{12/12}$, # $p<0,05$ i ## $p<0,01$ u poređenju sa $DM_{12/12}$ grupom). Skraćenice: $DM_{12/12}$, grupa sa dijabetes melitusom; $K_{6/18}$, grupa izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h; $DM_{6/18}$, grupa sa dijabetes melitusom izložena ciklusu svetlo/tama 6/18 h.

5. DISKUSIJA

Eksperimentalne i kliničke studije pokazale su da, pored drugih dijabetičkih komplikacija, afektivni poremećaji postaju sve češća pojava u sklopu dijabetesa (Zhu i sar. 2021, Buchberger i sar. 2016). Povećana prevalencija anksioznosti i depresije kod pacijenata sa dijabetesom nije samo posledica metaboličkog disbalansa, već i složenih neurobioloških promena koje prate progresiju bolesti (Buchberger i sar. 2016). Hronična hiperglikemija predstavlja centralni okidač koji inicira kaskadu patofizioloških promena, uključujući povećanu produkciju ROS, što dovodi do oštećenja mitohondrija i disfunkcije ćelijskog metabolizma (Xu i sar. 2014). Ovaj proces često je praćen povećanjem nivoa proinflammatoryh citokina, poput TNF- α i IL-6, koji značajno utiču na funkciju krvno-moždane barijere, narušavajući njen integritet i povećavajući propustljivost za inflamatorne ćelije (Wang i sar. 2021). Posledično, inflamatorni faktori prodiru u mozak, dodatno oštećujući neuronske mreže, naročito u regijama poput hipokampusa, amigdale i prefrontalnog korteksa, koje su ključne za emocionalnu regulaciju i odgovor na stres (Casado-Sainz i sar. 2022).

Pored neuroinflamacije, oksidativni stres ima ključnu ulogu u napredovanju neuroloških komplikacija dijabetesa. Lipidna peroksidacija, koja nastaje reakcijom ROS sa membranskim lipidima, značajno narušava strukturni integritet moždanih ćelija i doprinosi njihovoj disfunkciji (Wang i sar. 2021, Xu i sar. 2014). Čak i u odsustvu hiperglikemije insulinska rezistencija je povezana sa povećanim oksidativnim stresom i mitohondrijskom disfunkcijom u neuronima što uslovljava njihovu apoptozu. Takođe insulinska rezistencija je udružena sa povećanom aktivnošću glikogen sintaza kinaze 3 β (GSK-3 β) što doprinosi hiperfosforilaciji tau proteina. Hiperfosforilisani tau protein može da se prenosi na susedne neurone čime podstiče dalju agregaciju tau proteina koji čak i nije strukturno izmenjen prionskim mehanizmom. Takođe hiperfosforilisani tau protein doprinosi aktivaciji mikroglije i sekreciji proinflammatoryh citokina (IL-1, TNF- α , IL-6) koji dalje posredstvom tau kinaza podstiču agregaciju tau proteina i pojačavaju neuroinflamaciju. Insulinska rezistencija je udružena i sa povećanom agregacijom amiloida β (A β) što doprinosi oksidativnom stresu i neurodegeneraciji (Fluca i sar. 2024). Sa razvojem hiperglikemije dodatno se pogoršavaju neuroinflamacija, oksidativni stres i lipidna peroksidacija u mozgu, što dalje doprinosi neurodegenerativnim procesima i oštećenju neuronske funkcije, čime se povećava rizik od razvoja anksioznosti (Wang i sar. 2021, Xu i sar. 2014). Naši rezultati potvrđuju ove nalaze, jer je eksperimentalni model dijabetesa korišćen u studiji povezan sa razvojem anksioznog ponašanja i povećanjem lipidne peroksidacije u mozgu pacova (Grafikon 4.2., 4.3. i 4.4.). Ovi nalazi dodatno naglašavaju značaj oksidativnog stresa kao jednog od ključnih faktora u patofiziologiji neuroloških komplikacija izazvanih dijabetesom i ukazuju na potrebu za istraživanjem potencijalnih terapijskih strategija usmerenih na ovaj patološki proces.

Smanjenje telesne mase, kontrolisani unos zasićenih masti i redovna fizička aktivnost dobro su poznati načini za prevenciju dijabetesa i odlaganje njegovih komplikacija, uključujući anksioznost. Ove promene u načinu života pružaju višestruke koristi, pozitivno utičući na metaboličke procese i funkciju nervnog sistema. Na primer, smanjen unos zasićenih masnih kiselina snižava nivo lipida u cirkulaciji, što ublažava lipidnu peroksidaciju i smanjuje oksidativni stres (Contreras-Zentella i sar. 2024). Redovna fizička aktivnost ne samo da poboljšava osetljivost na insulin, već i povećava ekspresiju neurotrofičkog moždanog faktora (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), koji ima ključnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti i preživljavanju neurona (Desrumaux i sar. 2005). Uz ove dobro poznate mere, naši rezultati ukazuju da smanjena izloženost svetlosti, kroz skraćeni fotoperiod, može biti dodatna strategija za ublažavanje anksioznosti izazvane dijabetesom. Mehanizam ovog pristupa uključuje regulaciju cirkadijalnih ritmova, koji posredno utiču na nivo hormona stresa, poput kortizola, kao i na održavanje oksidativne ravnoteže u mozgu.

Naši podaci pokazuju da skraćeni fotoperiod smanjuje anksiozno ponašanje, što se jasno vidi u testu uzdignutog krstastog lavirinta i testu otvorenog polja. U testu uzdignutog krstastog lavirinta, anksiolitički efekat skraćenog fotoperioda ogleda se u produženju vremena provedenog u otvorenim kracima i smanjenju vremena provedenog u zatvorenim kracima (Grafikon 4.2.). Slično tome, test otvorenog polja pokazao je da pacovi sa dijabetesom, izloženi skraćenom fotoperiodu, provode više vremena u centralnom polju. Iako indeks tigmoksije nije bio promenjen, povećano vreme u centralnom polju sugerise smanjenje anksioznosti i povećanje eksplorativne aktivnosti.

Analiza drugih parametara, poput ukupno pređenog puta, pređenog puta u centralnom i perifernom delu, kao i brzine kretanja životinja, ukazuje na smanjeno eksplorativno ponašanje kod dijabetičnih pacova. Međutim, ovi parametri su se značajno poboljšali nakon primene skraćenog fotoperioda (Grafikon 4.3). Ove promene sugerisu da skraćeni fotoperiod može povoljno uticati na motoričku funkciju i emocionalnu regulaciju kod pacova sa dijabetesom. Važno je napomenuti da navedeni parametri, iako korisni, nisu dovoljno osetljivi niti specifični za precizno merenje anksioznog ponašanja. Ipak, kada se rezultati testa otvorenog polja kombinuju sa nalazima iz testa uzdignutog krstastog lavirinta, dobija se sveobuhvatnija slika. Ovi nalazi ukazuju na to da skraćeni fotoperiod, pored povećanja eksplorativne aktivnosti, ima izražen anksiolitički efekat.

Jedan od mehanizama koji doprinosi anksiolitičkom efektu skraćenog fotoperioda može biti smanjenje oksidativnog stresa. Prvi dokazi koji povezuju oksidativni stres sa razvojem anksioznosti bili su indirektni, poput istraživanja Souza i sar. (2007), Desrumaux i sar. (2005), Berry i sar. (2007) i Masood i sar. (2008). Na primer, ishrana bogata saharozom povećava oksidaciju proteina u frontalnom korteksu, što je povezano sa anksioznim ponašanjem (Souza i sar. 2007). Studije na miševima pokazale su da nedostatak vitamina E izaziva anksioznost usled povećanog oksidativnog stresa (Desrumaux i sar. 2005), dok su Berry i sar. (2007) ukazali na povezanost starenja sa porastom oksidativnog stresa i anksioznim ponašanjem. Direktni dokazi o ulozi oksidativnog stresa u razvoju anksioznosti pruženi su u novijim istraživanjima, kao što je studija Dang i sar. (2022), koja je pokazala da edaravon smanjuje anksiozno ponašanje redukcijom nivoa MDA i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima u hipokampusu i prefrontalnom korteksu. Naša studija ukazuje na slične mehanizme, budući da je skraćeni fotoperiod značajno smanjio lipidnu peroksidaciju izazvanu DM-om u korteksu, hipokampusu i talamusu pacova (Grafikon 4.4.). Takođe je pronađena korelacija između nivoa MDA i anksioznog ponašanja u testovima uzdignutog krstastog lavirinta i otvorenog polja, što sugerise da antioksidativni efekat skraćenog fotoperioda može biti ključan za njegovo anksiolitičko dejstvo.

Anksiolitički i antioksidativni efekat smanjene izloženosti svetlu može biti posredovan melatoninom (Grafikon 4.1. C). Melatonin, hormon koji proizvodi pinealna žlezda i koji ima ključnu ulogu u regulaciji ciklusa spavanja i budnosti, poseduje višestruka biološka svojstva, uključujući antiinflamatorno, antioksidativno i neuroprotektivno dejstvo. Njegov potencijal za smanjenje anksioznosti potvrđen je kliničkim studijama, poput istraživanja Madsen i sar. (2020), koje su pokazale da melatonin, dat kao premedikacija, značajno smanjuje preoperativnu anksioznost u poređenju sa placebo. Ovaj efekat se pripisuje sposobnosti melatonina da reguliše aktivnost hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine, smanjujući lučenje kortizola, hormona stresa koji značajno doprinosi razvoju anksioznosti. Dodatno, eksperimentalne studije na pacovima pokazale su da melatonin ublažava depresiju i anksioznost smanjenjem neuroinflamacije, delimično posredovane povećanom proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina koje modulišu crevno-moždanu osovinu (Lv i sar. 2020). Ove

promene smanjuju nivo inflamatornih citokina i poboljšavaju serotoninsku neurotransmisiju, ključni regulator raspoloženja.

Uloga melatonina u smanjenju oksidativnog stresa dobro je dokumentovana. Melatonin smanjuje nivo MDA, glavnog markera lipidne peroksidacije, povećava koncentraciju GSH, glavnog intracelularnog antioksidansa, i indukuje ekspresiju Nrf2, transkripcionog faktora koji stimuliše sintezu antioksidativnih enzima poput SOD i GPx (He i sar. 2018, Zhu i sar. 2021). Naši rezultati ukazuju na slične mehanizme, jer je skraćena izloženost svetlu povezana sa značajnim smanjenjem lipidne peroksidacije u mozgu pacova sa dijabetesom (Grafikon 4.4.), što dodatno podržava hipotezu da melatonin igra ključnu ulogu u ovom procesu. Slični nalazi iz studije Saxena i sar. (2010) potvrđuju ovu vezu, pokazujući da primena melatonina smanjuje lipidnu peroksidaciju izazvanu streptozotocinom u hipokampusu pacova. Ovi nalazi jasno ukazuju na to da melatonin ima važnu ulogu u modulaciji oksidativnog stresa i neuroinflamacije u kontekstu dijabetesa.

Smanjenje anksioznosti izazvano skraćenim fotoperiodom negativno korelira sa povećanjem koncentracije DHA u serumu, što ukazuje na složenu, ali potencijalno značajnu ulogu ove omega-3 masne kiseline u očuvanju mentalnog zdravlja kod dijabetesa (Grafikon 4.8., Tabela 4.1.). DHA nije samo ključna komponenta strukturalnog integriteta neuronalnih membrana, već ima centralnu ulogu u održavanju sinaptičke plastičnosti i inflamatorne homeostaze. Njena prisutnost u fosfolipidnom dvosloju neurona omogućava optimalan protok signala i stabilnost sinaptičkih veza, što je od suštinske važnosti za normalno funkcionisanje mozga. Nedostatak DHA, često uzrokovan disfunkcijom transportera u endotelnim ćelijama krvno-moždane barijere, može dovesti do gubitka neurona u ključnim regijama mozga, poput hipokampusa i cerebeluma. Ova degeneracija direktno doprinosi razvoju anksioznosti i drugih afektivnih poremećaja, naglašavajući značaj optimalnog nivoa DHA za očuvanje mentalnog zdravlja kod osoba sa dijabetesom (Neto i sar. 2021). Naša studija, kroz negativnu korelaciju između nivoa DHA u serumu i anksioznog ponašanja, potvrđuje da DHA može imati zaštitnu ulogu u ovom kontekstu, smanjujući štetne efekte metaboličkog stresa izazvanog dijabetesom.

Studije na humanoj populaciji dodatno podržavaju ovaj zaključak. Na primer, sniženi nivo DHA u plazmi i membrani eritrocita primećen je kod osoba sa socijalnim anksioznim poremećajem, što ukazuje na potencijalnu vezu između niskog nivoa DHA i povećane osetljivosti na anksioznost (Muscaritoli 2021). Ovi nalazi naglašavaju značaj adekvatnog unosa DHA u očuvanju emocionalne stabilnosti i mentalnog zdravlja. Interventne studije sa suplementacijom DHA pružile su dodatne dokaze o njenoj terapijskoj vrednosti. Na primer, kod psihotičnih pacijenata lečenih risperidonom, povećanje unosa DHA rezultiralo je značajnim smanjenjem simptoma anksioznosti i depresije, što ukazuje na njenu potencijalnu ulogu u poboljšanju kvaliteta života ovih pacijenata (Fatemi i sar. 2020). Slični rezultati primećeni su u eksperimentalnim studijama na gojaznim pacovima, kod kojih je suplementacija DHA dovela do smanjenja nivoa inflamatornih markera, poput IL-6 i TNF- α , što je pratilo poboljšanje inflamatornog statusa i smanjenje simptoma povezanih sa inflamacijom i metaboličkim disbalansom (Robinson i sar. 2019, Neto i sar. 2021). Ovi podaci jasno ukazuju na to da DHA ima značajan potencijal da ublaži emocionalne i inflamatorne komplikacije povezane sa dijabetesom, čineći je obećavajućim kandidatom za adjuvantnu terapiju, posebno u kontekstu složenih metaboličkih i neuroloških poremećaja.

Ipak, iako su ovi nalazi obećavajući, naša studija ne pruža definitivni dokaz o uzročno-posledičnoj vezi između nivoa DHA u serumu i smanjenja anksioznosti. Povećanje nivoa PUFA u serumu ne mora nužno reflektovati promene u sastavu masnih kiselina u mozgu, što otežava interpretaciju ovih rezultata. Na primer, istraživanje Tanprasertsuk i sar.

(2019) pokazalo je slabu korelaciju između nivoa zasićenih masnih kiselina, MUFA i PUFA u serumu i mozgu, osim za α -linolensku kiselinu. Ovi rezultati sugeriraju da nivoi DHA u serumu mogu biti korisni kao marker za anksiolitički efekat skraćenog fotoperioda, ali ne i kao mehanizam koji direktno utiče na smanjenje anksioznosti. Naši nalazi ističu potrebu za daljim istraživanjima kako bi se bolje razumela uloga DHA u modulaciji emocionalnog ponašanja kod dijabetesa.

Pored DHA, promene u profilu drugih masnih kiselina takođe su analizirane u našoj studiji, ali njihova uloga u anksiolitičkom efektu skraćenog fotoperioda ostaje nedovoljno razjašnjena. Na primer, koncentracije MUFA C18:1 ω 7 i C18:1 ω 9 bile su povećane nakon smanjene izloženosti svetlosti, ali nije pronađena značajna korelacija između njihovih nivoa i anksioznog ponašanja (Tabela 4.1.). Oleinska kiselina, kao glavna MUFA, pokazuje kontradiktorne rezultate u različitim studijama. Australijska studija ukazuje na povećan rizik od anksioznosti sa rastom nivoa oleinske kiseline, sugerirajući da visoke koncentracije mogu negativno uticati na emocionalnu stabilnost (Daley i sar. 2015). Suprotno tome, istraživanje sprovedeno među iranskim ženama pokazalo je da povećan unos oleinske kiseline može smanjiti simptome anksioznosti, verovatno zahvaljujući njenim antiinflamatornim svojstvima i povoljnom uticaju na očuvanje integriteta ćelijskih membrana (Fatemi i sar. 2020). Razlike u ovim nalazima mogu biti rezultat različitih populacionih karakteristika, prehrambenih navika, genetskih faktora ili metodoloških pristupa. Iako su MUFA poznate po svom uticaju na lipidnu homeostazu i stabilnost ćelijskih membrana, njihova uloga u neurobiološkim procesima koji utiču na emocionalno ponašanje još uvek nije dovoljno istražena. Potencijalni mehanizmi mogli bi uključivati interakcije sa inflamatornim signalnim putevima, oksidativnim stresom i neurotransmitterskom aktivnošću (Tanprasertsuk i sar. 2019). Ova kontradiktorna otkrića ističu potrebu za daljim istraživanjima koja bi obuhvatila širi spektar masnih kiselina i njihove međusobne interakcije u regulaciji emocionalnog ponašanja.

Naša studija pruža važne uvide u efekat dijabetesa na lipidni profil. Dijabetes je izazvao hipertrigliceridemiju, dok nije značajno uticao na ukupni nivo holesterola i HDL holesterola (Tabela 4.1.). S druge strane, skraćeni dnevni fotoperiod smanjio je nivo triglicerida u serumu i povećao nivo HDL holesterola kod dijabetičnih pacova, što ukazuje na potencijalni protektivni efekat ovog pristupa u kontekstu dislipidemije izazvane dijabetesom. Međutim, odnos između promena u lipidnom profilu i emocionalnog stanja je složen. Prethodne studije su pokazale da je povećanje HDL holesterola povezano sa negativnim raspoloženjem, dok su povišeni trigliceridi često povezani sa poboljšanjem raspoloženja kod anksioznih pacijenata (Lieberman i sar. 2012). Ove korelacije naglašavaju kompleksnost odnosa između lipidnog profila i emocionalnih odgovora, ističući potrebu za daljim istraživanjima koja bi razjasnila značaj ovih promena u kontekstu dijabetesa i anksioznosti.

Elektroretinografski zapisi pokazali su da primena egzogenog melatonina poboljšava vid na eksperimentalnim modelima miševa i pacova sa dijabetesom (Thebeau i sar. 2020, Salido i sar. 2013). Melatonin, hormon sa ključnom ulogom u regulaciji cirkadijalnih ritmova i antioksidativnim svojstvima, direktno štiti retinu od oštećenja izazvanih hiperglikemijom i oksidativnim stresom. Njegovo dejstvo uključuje smanjenje lipidne peroksidacije, povećanje ekspresije antioksidativnih enzima i suzbijanje inflamatornih procesa (Ahmad i sar. 2023). Međutim, većina dosadašnjih istraživanja fokusirala se na egzogeni primenu melatonina, dok je prirodna stimulacija njegove sinteze putem smanjenja izloženosti svetlosti ostala relativno neistražena. Naša studija prva ukazuje na potencijalni zaštitni efekat smanjene izloženosti svetlosti kao prirodnog stimulanisa za sintezu melatonina u dijabetičnoj retini, otvarajući novu perspektivu u istraživanju DR-a.

Zaštitni efekat smanjene izloženosti svetlosti evidentan je kroz ublažavanje ranih vaskularnih promena, što je jasno prikazano u našoj studiji (Grafikon 4.9. i 4.10.). Rane vaskularne promene, poput povećane propustljivosti kapilara i gubitka pericita, predstavljaju ključne početne manifestacije DR-a i često signaliziraju progresiju ka ozbiljnijim komplikacijama. Povećana propustljivost kapilara narušava delikatnu ravnotežu BRB, omogućavajući ulazak plazmatskih proteina i inflamatornih ćelija u retinalno tkivo. Ova disrupcija BRB doprinosi razvoju edema i stvara inflamatorno okruženje koje dodatno pogoršava postojeća oštećenja. Naši rezultati pokazuju da skraćen fotoperiod ne samo da smanjuje propustljivost kapilara već i doprinosi stabilizaciji mikrovaskularnog sistema retine, čime se očuvavaju njen integritet i funkcija. Ovaj nalaz naglašava potencijal prirodnih intervencija, poput smanjenja svetlosne stimulacije, kao neinvazivnog metoda za usporavanje progresije DR.

Jedan od ključnih elemenata vaskularnih promena u DR je gubitak pericita, ćelija koje imaju centralnu ulogu u održavanju stabilnosti kapilara. Periciti regulišu protok krvi kroz mikrovaskulaturu i održavaju čvrste spojeve između endotela kapilara. Njihov gubitak, uzrokovan hiperglikemijom i inflamatornim procesima, dovodi do povećane propustljivosti i nestabilnosti krvnih sudova (Beltramo i Porta 2013). Naša studija pokazuje da smanjena izloženost svetlosti može značajno doprineti očuvanju pericita, verovatno kroz modulaciju inflamatornih puteva i smanjenje nivoa ključnih proinflamatornih citokina, poput TNF- α i IL-1 β . Očuvanje pericita ima fundamentalni značaj u prevenciji progresije DR-a jer doprinosi održavanju vaskularnog integriteta i smanjuje rizik od daljih komplikacija.

Uz vaskularne promene, smanjenje glijalne aktivacije u retini predstavlja još jedan ključni nalaz naše studije. Glijalne ćelije, kao što su Milerove ćelije i astrociti, reaguju na metabolički stres izazvan hiperglikemijom povećanjem ekspresije GFAP-a, što označava početak glioze. Iako gliozna u početku može imati zaštitnu ulogu, poput očuvanja homeostaze i odgovora na povrede, njen produženi efekat postaje patološki, ozbiljno narušavajući funkcionalnost retine i doprinoseći progresivnom oštećenju neuronskih mreža. Naši rezultati ukazuju na to da smanjena svetlosna stimulacija značajno smanjuje ekspresiju GFAP-a, čime se redukuje glijalna aktivacija i potencijalno sprečavaju dugoročna oštećenja u retini (Grafikon 4.13.). Ovaj efekat je od izuzetne važnosti jer ukazuje na mogućnost smanjenja inflamatornog stresa i očuvanja neuronske funkcije putem jednostavne regulacije izloženosti svetlosti.

Zaštitni efekti smanjene svetlosne stimulacije u DR povezani su i sa njenim antiinflamatornim dejstvom, povećanjem prometa holesterola i redistribucijom Aqp4. Antiinflamatorna svojstva melatonina i smanjene svetlosne stimulacije u kontekstu DR dobro su dokumentovana (Oliveira-Abreu i sar. 2021, Tu i sar. 2020). Brojne eksperimentalne studije pokazale su da primena melatonina kod modela dijabetesa dovodi do značajnog smanjenja proinflamatornih citokina, uključujući IL-1 β , TNF- α i IL-6, kao i redukcije ekspresije iNOS-a (Chitimus i sar. 2020). Naša studija pruža dodatne dokaze o antiinflamatornim efektima skraćenog fotoperioda, potvrđujući smanjenje ekspresije IL-1 β i TNF- α u retini i RPE sloju. Ovo smanjenje inflamatornih markera ukazuje na dodatni mehnaizam protektivnog dejstva skraćenog izlaganja svetlosti na očuvanje funkcionalnostikrvnih sudova i neurona u retini.

Pored redukcije sinteze proinflamatornih citokina naši rezultati ukazuju na redistribuciju Aqp4, ključnog proteina odgovornog za homeostazu vode u retini. Perivaskularna lokalizacija Aqp4, indukovana smanjenom svetlosnom stimulacijom, doprinosi stabilizaciji BRB-a i smanjenju edema (Nicchia i sar. 2016). Ovo predstavlja

dodatni mehanizam kojim smanjena svetlosna stimulacija može doprineti očuvanju funkcionalnosti retine sinergistički sa antiinflamatornim i antioksidativnim dejstvom. Naši rezultati sugerišu da ovi efekti deluju integrisano, pružajući osnovu za dalji razvoj prirodnih i neinvazivnih terapijskih strategija za prevenciju i lečenje DR.

Povezanost između povećane ekspresije Aqp4 i retinalnog edema u STZ-indukovanom modelu dijabetesa dobro je dokumentovana i pruža ključne uvide u patofiziologiju dijabetičnih komplikacija oka (Cui i sar. 2012). Aqp4, glavni akvaporinski kanal u astrocitima i Milerovim ćelijama, ima ključnu ulogu u regulaciji osmotske ravnoteže i održavanju integriteta BRB-a. Njegova uloga u dijabetičnoj retini je kompleksna i zavisi od obrasca lokalizacije i ekspresije. Dok difuzna ekspresija Aqp4 u Milerovim ćelijama doprinosi citotoksičnom edemu akumulacijom vode u ćelijama, perivaskularna ekspresija stabilizuje vaskularni sistem, posebno u dubokom kapilarnom pleksusu retine (Oosuka i sar. 2020, Nicchia i sar. 2016).

Naša studija pruža nova saznanja o uticaju smanjene izloženosti svetlosti na regulaciju ekspresije Aqp4 u dijabetičnoj retini. Rezultati pokazuju da skraćena svetlosna stimulacija značajno smanjuje ukupnu ekspresiju Aqp4, dok istovremeno povećava njegovu lokalizaciju u perivaskularnim regionima (Grafikon 4.11. i 4.12.). Ova redistribucija Aqp4 može se posmatrati kao adaptivni odgovor retinalnog tkiva na metabolički stres izazvan hiperglikemijom. Smanjenje ukupne ekspresije Aqp4 doprinosi smanjenju rizika od citotoksičnog edema, koji nastaje usled prekomerne akumulacije vode u citoplazmi Milerovih ćelija. Istovremeno, perivaskularna lokalizacija Aqp4 ima ključnu ulogu u očuvanju funkcionalnosti BRB-a, omogućavajući preciznu regulaciju vodene homeostaze i efikasno uklanjanje viška tečnosti iz vaskularnog prostora (Oosuka i sar. 2020).

Aqp4 je ključni regulator osmotske homeostaze u centralnom nervnom sistemu, uključujući retinu. Njegova uloga prevazilazi samu regulaciju vodenog transporta, jer značajno doprinosi uklanjanju metaboličkih nusprodukata i održavanju jonske ravnoteže tokom metaboličkog stresa (Amiry-Moghaddam i Ottersen 2003, Verkman i sar. 2006). U mozgu, Aqp4 ima ključnu ulogu u regulaciji intersticijalne tečnosti i olakšavanju uklanjanja toksičnih metabolita, poput beta-amiloidnog proteina, putem glifatičkog sistema (Ilyff i sar. 2012). Glifatički sistem koristi Aqp4 za omogućavanje protoka cerebrospinalne tečnosti kroz intersticijalne prostore, čime doprinosi detoksikaciji i održavanju optimalnog okruženja za neuronsku aktivnost. Disfunkcija Aqp4 u ovom procesu može doprineti akumulaciji toksina i razvoju neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alchajmerovu bolest. Nedostatak Aqp4 u modelima Alchajmerove bolesti povezan je sa povećanom akumulacijom A β i tau proteina, gubitkom sinaptičkih proteina i pogoršanjem kognitivnih deficita (Silva i sar. 2021). Redistribucija Aqp4 iz krajnjih nastavaka astrocita u parenhimalne nastavke, što je karakteristično za model Alchajmerove bolesti, smanjuje efikasnost klirensa A β i doprinosi pogoršanju simptoma (Smith i sar. 2019). Ovo ukazuje na važnost pravilne lokalizacije Aqp4 za optimalno funkcionisanje glifatičkog sistema i uklanjanje toksičnih metabolita. Primena 5-kafeoilhinske kiseline (eng. *5-caffeoylquinic acid*, 5-CQA) pokazala je da ovaj polifenol utiče na normalizaciju perivaskularne lokalizacije Aqp4, čime se poboljšava klirens A β kroz glifatički sistem (Silva i sar. 2021). 5-CQA, kao najzastupljeniji polifenol u kafi, poboljšava kognitivne funkcije i smanjuje depozite A β plakova u hipokampusu na APP/PS2 transgenom modelu miša (Ishida i sar. 2020). Njegovo dejstvo uključuje povećanje ekspresije LRP1 receptora (eng. *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*), koji pospešuje efluks A β , kao i regulaciju funkcionalnosti Aqp4 u glifatičkom sistemu. Ovi nalazi ukazuju na potencijal 5-CQA da modulacijom Aqp4 doprinese prevenciji ili usporavanju progresije Alchajmerove bolesti (Ishida i sar. 2020).

Tokom ranog postnatalnog razvoja, Aqp4 pokazuje specifičan obrazac ekspresije koji je ključan za pravilnu diferencijaciju astrocita i Milerovih ćelija, kao i za formiranje krvno-moždane barijere i sinaptičke veze (Cibelli i sar. 2024). Njegova progresivna ekspresija omogućava glijalnim ćelijama da odgovore na osmotske izazove povezane sa neuronskom aktivnošću i prilagode ekstracelularni prostor tokom sinaptičkog sazrevanja. Biomehaničke sile generisane Aqp4-posredovanim vodenim tokovima podržavaju remodelovanje tkiva i migraciju ćelija, što je ključno za razvoj funkcionalnih neuronskih mreža. Zanimljivo je da je uočeno obrnuto proporcionalno povećanje ekspresije Aqp4 i smanjenje TRPV4 (eng. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*) tokom rane postnatalne faze, što ukazuje na diferencijalnu ulogu ovih kanala u razvoju mozga i retine (Cibelli i sar. 2024). Aqp4 posreduje biomehaničke promene koje olakšavaju migraciju glijalnih progenitora, dok TRPV4 ima ključnu ulogu u ranim kalcijumskim signalima, potrebnim za sazrevanje ćelija i formiranje funkcionalnih sinaptičkih veza.

Inhibicija Aqp4 pomoću 2-nikotinamid-1,3,4-tiadiazola (eng. *2-nicotinamide-1,3,4-thiadiazole*, TGN-020), specifičnog inhibitora ovog kanala, tokom primene pentilentetrazol modela za izazivanje epileptičkih napada (PTZ-kindling), značajno smanjuje intenzitet i trajanje napada, produžava latentni period do početka napada i ublažava oštećenja pamćenja izazvana napadima (Rostami i sar. 2024). Ovi rezultati ukazuju na ključnu ulogu Aqp4 u razvoju napada i kognitivnih poremećaja povezanih sa epileptičkom aktivnošću. Osim što omogućava efikasno uklanjanje kalijumovih jona iz ekstracelularnog prostora, Aqp4 održava jonsku ravnotežu, čime direktno utiče na neuronsku ekscitabilnost (Rostami i sar. 2024). Dalja istraživanja su neophodna kako bi se detaljnije razumela povezanost između funkcije Aqp4, regulacije vodene homeostaze i razvoja epileptičnih poremećaja, što bi moglo doprineti identifikaciji novih terapijskih pristupa.

Pored epilepsije, Aqp4 ima ključnu ulogu u razvoju poremećaja iz spektra neuromijelitis optika (eng. *neuromyelitis optica spectrum disorder*, NMOSD). Kod NMOSD, antitela na Aqp4 (AQP4-IgG) izazivaju oštećenje astrocita putem aktivacije sistema komplementa, što dovodi do inflamacije, demijelinizacije i narušavanja krvno-moždane barijere (Wu i sar. 2019). Oštećena barijera omogućava dalji ulazak antitela u centralni nervni sistem, čime se dodatno pogoršava inflamatorni proces. Posledično dolazi do gubitka mijelinskog omotača, oštećenja aksona i razvoja neuroloških simptoma kao što su gubitak vida usled optičkog neuritisa, slabost ili paraliza udova zbog transverzalnog mijelitisa i poremećaji funkcije mokraćne bešike ili creva. Terapijski pristupi uključuju imunosupresivne lekove, poput rituksimaba i eculizumaba, koji ciljano blokiraju ključne mehanizme inflamacije (Wu i sar. 2019). Eksperimentalni modeli NMOSD omogućavaju dublje razumevanje uloge Aqp4 u patogenezi i razvoj terapija koje bi mogle smanjiti oštećenja izazvana ovim poremećajem.

Uloga holesterola u zaštitnim efektima smanjene izloženosti svetlosti takođe ima velik značaj. Promet holesterola u retini ključan je za održavanje homeostaze ćelijskih membrana i sinaptičkih veza, dok njegovo nakupljanje ili poremećaj metabolizma može doprineti progresiji DR (Busik 2021). Smanjena izloženost svetlosti može stimulisati promet holesterola, čime se smanjuju toksični efekti njegovog nakupljanja u retini. Ovo ukazuje na dodatne mehanizme kroz koje prirodna modulacija melatonina može doprineti očuvanju retinalnog tkiva kod dijabetičnih pacijenata.

Antiinflamatorni efekat smanjene izloženosti svetlosti u retini može se dodatno povezati sa ubrzanim metabolizmom holesterola, što predstavlja važan aspekt homeostaze retinalnog tkiva kod dijabetesa. Holesterol ima ključnu ulogu u održavanju strukturalne

stabilnosti i funkcionalnosti retinalnih ćelija, ali njegovo prekomerno nakupljanje ili poremećaj metabolizma mogu doprineti patološkim procesima (Hammer i sar. 2017). Naša studija pruža jedinstveni uvid u to kako smanjenje dnevne izloženosti svetlosti može regulisati metabolizam holesterola, ukazujući na složene molekularne mehanizme uključene u ovaj proces.

Smanjena svetlosna stimulacija indukuje ekspresiju gena koji su ključni za sintezu, efluks i oksidaciju holesterola u RPE sloju, kao i za intraretinalnu razmenu holesterola. Naša analiza pokazala je da smanjena svetlosna stimulacija stimuliše sintezu holesterola u RPE sloju, što se ogleda u povećanoj ekspresiji *HMGCR*-a, ključnog gena koji kodira enzim odgovoran za kontrolu brzine sinteze holesterola (Grafikon 4.16.). *HMGCR* katalizuje ključni korak u mevalonatnom putu, konvertujući HMG-CoA u mevalonat, što predstavlja prvi i ograničavajući korak u biosintezi sterola (Busik 2021). Povećana ekspresija ovog gena u RPE sloju sugerira adaptivni odgovor na metabolički stres izazvan hiperglikemijom, s potencijalnom ulogom u očuvanju strukturalnog i funkcionalnog integriteta retine.

Fotoreceptori, kao ćelije sa najvišom metaboličkom aktivnošću holesterola u retini, preuzimaju većinu sterola iz egzogenih izvora, a ne iz endogene sinteze (Zekavat i sar. 2017, Zhang i sar. 2021, Zhu i sar. 2020). Ovo može objasniti zašto sinteza holesterola u retinalnom tkivu nije značajno povećana, uprkos adaptivnim promenama primećenim u RPE sloju. RPE, kao ključni sloj između krvnih sudova horioideje i retine, ima osnovnu ulogu u regulaciji transporta holesterola između cirkulacije i fotoreceptora. Sinteza holesterola u RPE sloju, stimulirana smanjenjem izloženosti svetlosti, može predstavljati deo mehanizma za održavanje holesterolske homeostaze u retini. Međutim, uloga povećane sinteze holesterola u RPE sloju u zaštiti od dijabetičnih promena još uvek je kontroverzna. Na primer, Pittler i sar. (2020) otkrili su da intravitrealna primena lovastatina, inhibitora *HMGCR*-a, uzrokuje strukturne promene u fotoreceptorima, što dovodi do njihove nekroze četiri nedelje nakon injekcije. Kasnije studije, međutim, sugerisu da ovi efekti nisu posledica inhibicije sinteze holesterola već defektne prenilacije proteina u fotoreceptorima, naglašavajući složenost ovog mehanizma (Roosing i sar. 2014).

Naša studija takođe pokazuje da smanjena dnevna izloženost svetlosti indukuje ekspresiju *APOE* gena u retini (Grafikon 4.16.), što ukazuje na ubrzanje intraretinalne razmene holesterola. ApoE, apolipoprotein sa ključnom ulogom u transportu lipida, posreduje u efluksu holesterola iz ćelija i njegovom prenosu do HDL čestica. Značaj ApoE u regulaciji razmene holesterola u retini potvrđen je na modelima *ApoE*^{-/-} miševa, koji pokazuju akumulaciju neesterifikovanog holesterola, povezanu sa progresivnom degeneracijom Milerovih ćelija i elektrofiziološkim promenama (Cao i sar. 2020, Tu i sar. 2021). ApoE nije ključan samo za efluks holesterola iz RPE sloja već i za održavanje lipidne homeostaze u fotoreceptorima, što doprinosi očuvanju njihove funkcionalnosti. Indukcija *APOE* gena u našoj studiji, posle smanjenja izloženosti svetlosti, jasno ukazuje na ubrzanje efluksa holesterola i dodatno osvetljava protektivni efekat ovog pristupa.

Pored transporta putem HDL i LDL čestica, višak holesterola u retini eliminiše se metabolizmom posredovanim enzimima *CYP27* i *CYP46*, koji konvertuju holesterol u oksisterole (Petrov i sar. 2019). Oksisteroli, kao metaboliti holesterola, igraju ključnu ulogu u regulaciji lipidne homeostaze i inflamatornih odgovora. Naša studija pokazuje da smanjena svetlosna stimulacija povećava ekspresiju gena *CYP27* u RPE sloju, što ukazuje na ubranu oksidaciju holesterola. Povećana transkripcija *CYP27* može predstavljati adaptivni odgovor na povišene nivoe oksidovanih lipida izazvane hiperglikemijom, omogućavajući efikasnije uklanjanje toksičnih lipidnih metabolita. Ovo je od posebnog značaja u kontekstu dijabetičnih

promena, gde povećana oksidacija holesterola doprinosi očuvanju funkcionalnosti RPE sloja i fotoreceptora. Dodatno, naši rezultati sugerišu da povećana transkripcija CYP27 može služiti kao kompenzatorni mehanizam za disfunkciju enzima u uslovima hiperglikemije (Aschner i sar. 2021).

Uloga melatonina u regulaciji vizuelnog ciklusa u RPE sloju još uvek nije dovoljno istražena, iako je poznato da ima ključnu ulogu u održavanju cirkadijalnih ritmova i smanjenju oksidativnog stresa. Iako je melatonin prepoznat kao važan faktor u mnogim procesima u organizmu, njegovo direktno povezivanje sa metabolizmom retinoida u retini nije dovoljno proučeno. Prethodne studije samo su delimično ukazivale na moguću vezu između melatonina i vizuelnog ciklusa. Na primer, jedno istraživanje je pokazalo da inhibicija vizuelnog ciklusa izotretinoinom može smanjiti nivo melatonina i poremetiti cirkadijalne ritmove (Madke i sar. 2015). Naša studija donosi nova saznanja, prvi put pokazujući da smanjena izloženost svetlosti može ubrzati regeneraciju 11-*cis* retinala. Ovaj efekat se postiže aktivacijom gena *LRAT* i *RPE65* (Grafikon 4.15.), koji su ključni za vizuelni ciklus. Ovi rezultati ukazuju na važnost svetlosnih uslova ne samo za održavanje ritma organizma već i za direktan uticaj na funkciju retine, otvarajući nove mogućnosti za dalje istraživanje i potencijalne terapijske pristupe.

Vizuelni ciklus, poznat i kao retinoidni ciklus, ključan je proces u regeneraciji 11-*cis* retinala, esencijalnog hromofora rodopsina, koji omogućava fototransdukciju. Proces započinje redukcijom *trans*-retinala u *trans*-retinol u fotoreceptorima, nakon čega *trans*-retinol migrira do RPE sloja. U ovom sloju, enzim LRAT katalizuje esterifikaciju *trans*-retinola u retinil estere, koji predstavljaju skladišni oblik vitamina A i osnovu za dalju regeneraciju retinala. Zatim, RPE65 preuzima ključnu ulogu u pretvaranju retinil estera u 11-*cis* retinol, omogućavajući obnovu rodopsina. Bez aktivnosti ovog enzima, regeneracija vizuelnog ciklusa bila bi značajno usporena, što bi rezultiralo smanjenom funkcionalnošću fotoreceptora, a u dugoročnom periodu moglo bi dovesti do degeneracije fotoreceptora (Sodi i sar. 2021).

Studije su pokazale da nusprodukti vizuelnog ciklusa, kao što je N-retiniliden-N-retiniletanolamin (eng. *N-retinylidene-N-retinylethanolamine*, A2E), doprinose razvoju bolesti poput Stargardtove bolesti i suve forme senilne degeneracije makule. Inhibitori vizuelnog ciklusa, poput emiksustata i fenretinida, pomažu u smanjenju nivoa A2E. Emiksustat deluje inhibicijom enzima RPE65 (Wang i sar. 2022), dok fenretinid, kao antagonist RBP4, smanjuje transport vitamina A iz jetre do oka, čime moduliše ciklus (Kim i Priefer 2021). Još jedan obećavajući agens je VM200, koji neutralizuje reaktivne aldehide nastale usled oksidativnog stresa, vezujući se za njih i sprečavajući stvaranje toksičnih spojeva kao što je A2E (Hussain i sar. 2018). Soraprazan ima dvostruko dejstvo: smanjuje formiranje lipofuscina inhibicijom kompleksa između fotooksidativnih produkata i proteina, kao i stimulacijom autofagije, što omogućava uklanjanje nagomilanog lipofuscina iz RPE (Julien-Schraermeyer i sar. 2020). Preklinička istraživanja ovih terapijskih pristupa pokazala su smanjenje akumulacije A2E i očuvanje funkcionalnosti fotoreceptora na životinjskim modelima. Međutim, klinička ispitivanja još uvek nisu dala dovoljno dokaza o njihovoj efikasnosti, što ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima kako bi se unapredila njihova primena u praksi (Julien-Schraermeyer i sar. 2020).

Naša studija ukazuje da smanjena svetlosna stimulacija značajno povećava ekspresiju *LRAT* i *RPE65*, što doprinosi ubrzanju regeneracije 11-*cis* retinola i potencijalno poboljšava adaptaciju RPE sloja na metabolički stres izazvan dijabetesom. LRAT omogućava efikasnu konverziju *trans*-retinola u retinil estere, osiguravajući dovoljnu rezervu za dalju regeneraciju

retinala (Grafikon 4.15.). S druge strane, RPE65 je od suštinskog značaja za izomerizaciju retinil estera u 11-*cis* retinol, čime omogućava kontinuiranu obnovu rodopsina i funkcionalnost fotoreceptora. Naša studija pokazuje da smanjenjem svetlosne stimulacije dolazi do povećanja ekspresije ovih gena, što može igrati ključnu ulogu u očuvanju funkcije fotoreceptora, posebno kod pacijenata sa dijabetesom. Ovi nalazi naglašavaju potencijal jednostavnih intervencija, poput regulacije svetlosnih uslova, za očuvanje vida u uslovima metaboličkog stresa.

Iako STZ-indukovani dijabetes nije izazvao promene u ekspresiji gena *LRAT* i *RPE65* u našoj studiji, naši nalazi ukazuju da smanjena izloženost svetlosti ima preventivni efekat. Ovi rezultati se uklapaju u ranija istraživanja koja su pokazala da značajne promene u vizuelnom ciklusu nastaju tek nekoliko nedelja nakon indukcije dijabetesa (Zhao i sar. 2017). Smanjena svetlosna stimulacija deluje unapred, aktivirajući ključne gene vizuelnog ciklusa i pre nego što metabolički stres značajno naruši retinalne funkcije. Ovo otkriće sugerise potencijalnu strategiju ranog očuvanja vizuelne funkcije kod pacijenata sa dijabetesom, pre nego što oštećenja postanu nepopravljiva.

Pored *LRAT* i *RPE65*, primećene su i promene u ekspresiji transkripcionih faktora *SOX9* i *OTX2*, koji su od ključne važnosti za regulaciju gena uključenih u metabolizam retinoida (Grafikon 4.15.). *SOX9* je esencijalan za održavanje diferencijacije i funkcionalnosti RPE sloja, dok *OTX2* stabilizuje ekspresiju gena povezanih sa metabolizmom retinoida (Masuda i sar. 2014). Takođe ovi transkripcioni faktori indukuju *LRAT* i *RPE65* gene (Liu i sar. 2023). Naši rezultati ukazuju da sinhrona indukcija *SOX9* i *OTX2* sa *LRAT* i *RPE65* ukazuje na kompleksnu regulaciju vizuelnog ciklusa pod uticajem svetlosnih uslova. Ovo sinergijsko delovanje doprinosi stabilnosti RPE sloja i podržava regeneraciju 11-*cis* retinala, čime se osigurava efikasno funkcionisanje fotoreceptora čak i u uslovima povećanog metaboličkog stresa. Naši rezultati ukazuju da bi mehanizam dejstva skraćenog izlaganja svetlosti na vizuelni ciklus bio sledeći. Skraćeno izlaganje svetlosti indukuje ekspresiju *SOX9* i *OTX2*, a oni zatim indukuju ekspresiju *LRAT* i *RPE65* koji ubrzavaju esterifikaciju i izomerizaciju *trans*-retinola u 11-*cis* retinol.

Inflamatorni citokini, poput IL-1 β i TNF- α , poznati su inhibitori razmene retinoida između fotoreceptora i RPE sloja, a njihova ekspresija je značajno smanjena u uslovima smanjene svetlosne stimulacije. Ovaj efekat dodatno olakšava protok retinoida između ovih slojeva, omogućavajući efikasniju regeneraciju 11-*cis* retinala. Interesantno je da su istraživanja retinilamina, inhibitora RPE65, pokazala da inhibicija vizuelnog ciklusa može imati paradoksalne efekte na vaskularne i inflamatorne promene izazvane dijabetesom. Liu i saradnici (2015) pokazali su da inhibicija RPE65 smanjuje oksidativni stres i inflamatorne odgovore, što dovodi do očuvanja integriteta kapilara u dijabetičnoj retini. Dodatno, delecija gena za *LRAT* takođe je pokazala protektivne efekte u kontekstu oksidativnog stresa, što ukazuje na složenost uloge vizuelnog ciklusa u dijabetičnim uslovima. Ova otkrića izazivaju interesovanje za detaljnije proučavanje molekularnih mehanizama kroz koje vizuelni ciklus utiče na patogenezu dijabetičkih promena.

Jedno od ograničenja ove studije je nekompletno uspostavljen translacioni model na ljude. Na primer, pacovi su noćne životinje sa cirkadijalnim ritmovima koji se razlikuju od ljudskih. Ipak, osnovni mehanizmi melatonina na inflamaciju, oksidativni stres i vaskularnu homeostazu slični su kod pacova i ljudi, što omogućava određeni stepen translacije nalaza. Potrebna su dodatna istraživanja koja bi uključila modele sa dnevnim ritmovima sličnijim ljudskim kako bi se bolje razumele kliničke implikacije skraćenog fotoperioda. Naši rezultati otvaraju nove mogućnosti za istraživanje kompleksne interakcije između vizuelnog ciklusa,

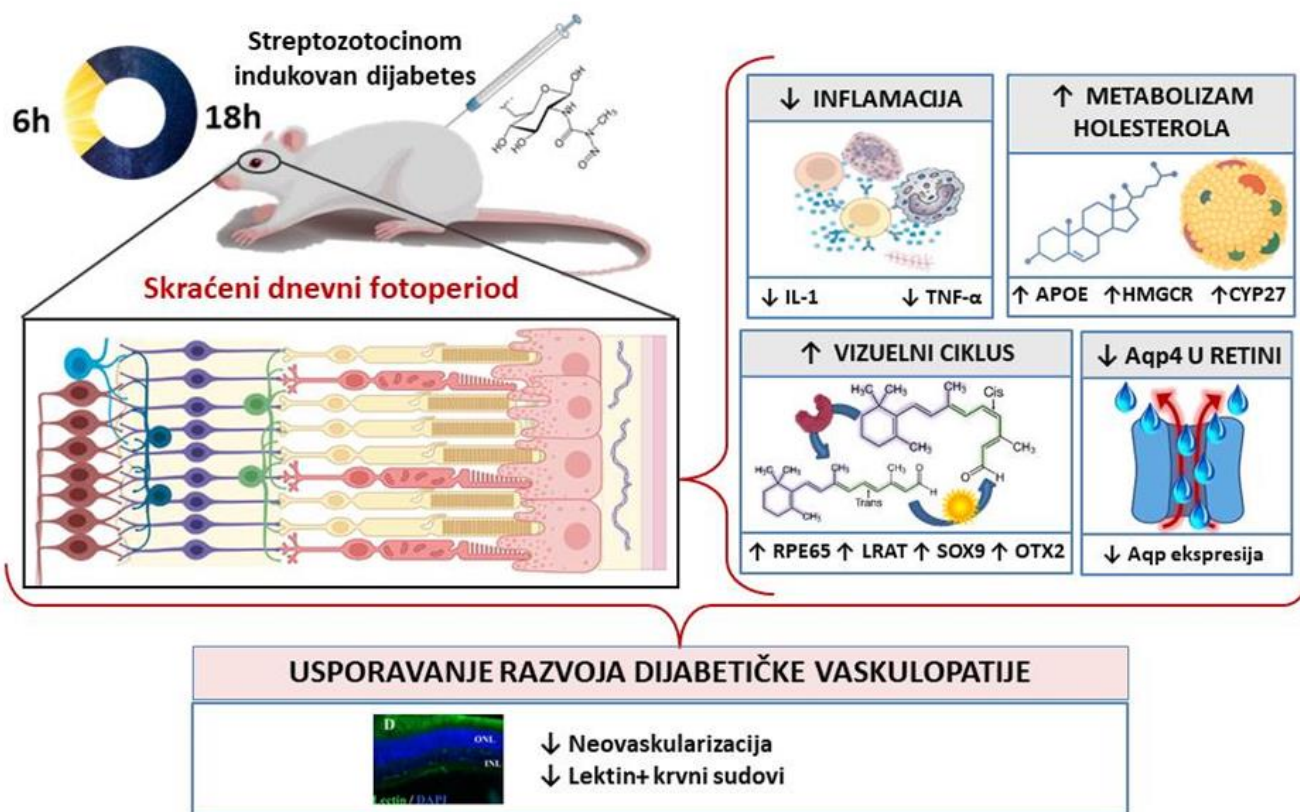
inflamatornih odgovora i vaskularnih promena. Skraćena svetlosna stimulacija predstavlja obećavajući pristup za ublažavanje komplikacija DM u retini, ali je neophodno dalje proučavanje kako bi se u potpunosti razumeo njen terapijski potencijal.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Skraćeni dnevni fotoperiod ublažava anksiozno ponašanje kod pacova u modelu dijabetesa indukovano streptozotocinom, delimično smanjenjem lipidne peroksidacije.
2. Mehanizmi antioksidativnog efekta variraju zavisno od regiona, sa povećanjem aktivnosti SOD, GPx i koncentracije tiolnih grupa u korteksu i talamusu.
3. Skraćeni fotoperiod povećava koncentraciju dokosaheksaenske kiseline u serumu koja korelira sa smanjenjem anksioznog ponašanja.
4. Dokosaheksaenska kiselina može biti korišćena kao marker anksioznog ponašanja kod DM.
5. Smanjena dnevna izloženost svetlosti ublažava rane promene u retini kod DM putem antiinflamatornog efekta, povećanjem perivaskularne ekspresije Aqp4 i povećanim prometom holesterola u RPE sloju i retini.
6. Smanjena izloženost svetlosti ubrzava vizuelni ciklus, ali značaj ovog nalaza treba dalje istražiti.

Smanjena izloženost svetlosti, uključujući izbegavanje socijalnog jet lag-a, smanjena upotreba mobilnih telefona i računara tokom noći, može biti razmatrana kao nova mera za ublažavanje anksioznosti u ranoj fazi DM. Produženi san i smanjena izloženost veštačkim izvorima svetlosti predstavljaju dodatne mere za odlaganje ranih vaskularnih promena, zapaljenja i poremećaja intraretinalnog metabolizma holesterola u oštećenje retine povezanom sa dijabetesom. Međutim, precizan translacioni potencijal ove studije treba dalje istražiti u ljudskoj populaciji.



Slika 6.1. Šematski prikaz uticaja skraćenog dnevnog fotoperioda na usporavanje razvoja dijabetičke vaskulopatije u streptozotocinom indukovnom modelu dijabetičke retinopatije kod pacova

Skraćeni dnevni fotoperiod dovodi do smanjena inflamacije (IL-1 i TNF- α) u retini i RPE sloju, povećava ekspresiju gena uključenih u lokalni metabolizam holesterola (APOE, HMGCR i CYP27) u retini i RPE sloju, povećava ekspresiju gena vizuelnog ciklusa u RPE sloju (RPE65, LRAT, OTX2 i SOX9) i smanjuje ekspresiju Aqp4 u retini pacova sa dijabetesom.

7. LITERATURA

A

- Abe, Y. O., Yoshitane, H., Kim, D. W., Kawakami, S., Koebis, M., Nakao, K., Aiba, A., Kim, J. K., & Fukada, Y. (2022). Rhythmic transcription of *Bmal1* stabilizes the circadian timekeeping system in mammals. *Nature Communications*, *13*(1), 4652. doi: 10.1038/s41467-022-32326-9.
- Ahmad, S. B., Ali, A., Bilal, M., Rashid, S. M., Wani, A. B., Bhat, R. R., & Rehman, M. U. (2023). Melatonin and health: Insights of melatonin action, biological functions, and associated disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *43*(6), 2437–2458. doi: 10.1007/s10571-023-01324-w.
- Almarghalani, D. A., Sha, X., Mrak, R. E., & Shah, Z. A. (2023). Spatiotemporal cofilin signaling, microglial activation, neuroinflammation, and cognitive impairment following hemorrhagic brain injury. *Cells*, *12*(8), 1153. doi: 10.3390/cells12081153.
- Amiry-Moghaddam, M., & Ottersen, O. P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(12), 991-1001. doi: 10.1038/nrn1252.
- Antar, S. A., Ashour, N. A., Sharaky, M., Khattab, M., Ashour, N. A., Zaid, R. T., Roh, E. J., Elkamhawy, A., & Al-Karmalawy, A. A. (2023). Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *168*, 115734. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115734.
- Aschner, M., Nguyen, T. T., Sinitskii, A. I., Santamaría, A., Bornhorst, J., Ajsuvakova, O. P., da Rocha, J. B. T., Skalny, A. V., & Tinkov, A. A. (2021). Isolevuglandins (isoLGs) as toxic lipid peroxidation byproducts and their pathogenetic role in human diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, *162*, 266–273. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.024.

B

- Baba, K., Ribelayga, C. P., Iuvone, P. M., & Tosini, G. (2018). The retinal circadian clock and photoreceptor viability. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1074*, 345–350. doi: 10.1007/978-3-319-75402-4_42.
- Beltramo, E., & Porta, M. (2013). Pericyte loss in diabetic retinopathy: Mechanisms and consequences. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(26), 3218–3225. doi: 10.2174/09298673113209990022.
- Bennet, C., Bettaiya, R., Rajanna, S., Baker, L., Yallapragada, P. R., Brice, J. J., White, S. L., & Bokara, K. K. (2007). Region-specific increase in the antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in the brain of rats exposed to lead. *Free Radical Research*, *41*(3), 267–273. doi: 10.1080/10715760600889855.
- Berry, A., Capone, F., Giorgio, M., Pelicci, P. G., de Kloet, E. R., Alleva, E., Minghetti, L., & Cirulli, F. (2007). Deletion of the lifespan determinant p66Shc prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice. *Experimental Gerontology*, *42*(1-2), 37–45. doi: 10.1016/j.exger.2006.05.018.
- Besharse, J.C., & Iuvone, P.M. (1983). Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*, *305*(5930), 133–135. doi: 10.1038/305133a0.

- Betts-Obregon, B. S., Mondragon, A. A., Mendiola, A. S., LeBaron, R. G., Asmis, R., Zou, T., Gonzalez-Fernandez, F., & Tsin, A. T. (2016). TGF β induces BIGH3 expression and human retinal pericyte apoptosis: A novel pathway of diabetic retinopathy. *Eye (London)*, *30*(12), 1639–1647. doi: 10.1038/eye.2016.179.
- Bilu, C., Einat, H., Zimmet, P., & Kronfeld-Schor, N. (2022). Circadian rhythms-related disorders in diurnal fat sand rats under modern lifestyle conditions: A review. *Frontiers in Physiology*, *13*, 963449. doi: 10.3389/fphys.2022.963449.
- Bocheva, G., Slominski, R. M., Janjetovic, Z., Kim, T. K., Böhm, M., Steinbrink, K., Reiter, R. J., Kleszczyński, K., & Slominski, A. T. (2022). Protective role of melatonin and its metabolites in skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1238. doi: 10.3390/ijms23031238.
- Buchberger, B., Huppertz, H., Krabbe, L., Lux, B., Mattivi, J. T., & Siafarikas, A. (2016). Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *70*, 70–84. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.04.019.
- Buijink, M. R., & Michel, S. (2021). A multi-level assessment of the bidirectional relationship between aging and the circadian clock. *Journal of Neurochemistry*, *157*(1), 73–94. doi: 10.1111/jnc.15286.
- Busik, J. V. (2021). Lipid metabolism dysregulation in diabetic retinopathy. *Journal of Lipid Research*, *62*, 100017. doi: 10.1194/jlr.TR120000981.

C

- Campbell, J. P., Zhang, M., Hwang, T. S., Bailey, S. T., Wilson, D. J., Jia, Y., & Huang, D. (2017). Detailed vascular anatomy of the human retina by projection-resolved optical coherence tomography angiography. *Scientific Reports*, *7*, 42201. doi: 10.1038/srep42201.
- Cao, X., Guo, Y., Wang, Y., Wang, H., Liu, D., Gong, Y., Wang, J., Chen, X., & Zhang, W. (2020). Effects of high-fat diet and ApoE deficiency on retinal structure and function in mice. *Scientific Reports*, *10*(1), 18601. doi: 10.1038/s41598-020-75576-7.
- Casado-Sainz, A., Gudmundsen, F., Baerentzen, S. L., Lange, D., Ringsted, A., Martinez-Tejada, I., Medina, S., Lee, H., Svarer, C., Keller, S. H., Schain, M., Kjaerby, C., Fisher, P. M., Cumming, P., & Palner, M. (2022). Dorsal striatal dopamine induces fronto-cortical hypoactivity and attenuates anxiety and compulsive behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology*, *47*(2), 454–464. doi: 10.1038/s41386-021-01207-y.
- Chen, V., & Ianuzzo, C. D. (1982). Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *60*(10), 1251–1256. doi: 10.1139/y82-183.
- Chen, J., Shao, Y., Sasore, T., Moiseyev, G., Zhou, K., Ma, X., Du, Y., & Ma, J. X. (2021). Interphotoreceptor retinol-binding protein ameliorates diabetes-induced retinal dysfunction and neurodegeneration through rhodopsin. *Diabetes*, *70*(3), 788–799. doi: 10.2337/db20-0609.
- Chitimus, D. M., Popescu, M. R., Voiculescu, S. E., Panaitescu, A. M., Pavel, B., Zagrean, L., & Zagrean, A. M. (2020). Melatonin's impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease. *Biomolecules*, *10*(9), 1211. doi: 10.3390/biom10091211.

Cibelli, A., Mola, M. G., Saracino, E., Barile, B., Abbrescia, P., Mogni, G., Spray, D. C., Scemes, E., Rossi, A., Spennato, D., Svelto, M., Frigeri, A., Benfenati, V., & Nicchia, G. P. (2024). Aquaporin-4 and transient receptor potential vanilloid 4 balance in early postnatal neurodevelopment. *Glia*, 72(5), 938–959. doi:10.1002/glia.24512.

Contreras-Zentella, M. L., Alatraste-Contreras, M. G., Suárez-Cuenca, J. A., & Hernández-Muñoz, R. (2024). Gender effect of glucose, insulin/glucagon ratio, lipids, and nitrogen-metabolites on serum HGF and EGF levels in patients with diabetes type 2. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11, 1362305. doi: 10.3389/fmolb.2024.1362305.

Cui, B., Sun, J. H., Xiang, F. F., Liu, L., & Li, W. J. (2012). Aquaporin 4 knockdown exacerbates streptozotocin-induced diabetic retinopathy through aggravating inflammatory response. *Experimental Eye Research*, 98, 37–43. doi: 10.1016/j.exer.2012.02.013.

D

Daley, C., Patterson, A., Sibbritt, D., & MacDonald-Wicks, L. (2015). Unsaturated fat intakes and mental health outcomes in young women from the Australian Longitudinal Study on Women's Health. *Public Health Nutrition*, 18(3), 546–553. doi: 10.1017/S1368980014000561.

Dang, R., Wang, M., Li, X., Wang, H., Liu, L., Wu, Q., Zhao, J., Ji, P., Zhong, L., Licinio, J., & Xie, P. (2022). Edaravone ameliorates depressive and lipi-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 41. doi: 10.1186/s12974-022-02400-6.

Darenskaya, M. A., Kolesnikova, L. I., & Kolesnikov, S. I. (2021). Oxidative stress: Pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 171(2), 179–189. doi: 10.1007/s10517-021-05191-7.

Desrumaux, C., Risold, P. Y., Schroeder, H., Deckert, V., Masson, D., Athias, A., Laplanche, H., Le Guern, N., Blache, D., Jiang, X. C., Tall, A. R., Desor, D., & Lagrost, L. (2005). Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB Journal*, 19(2), 296–297. doi: 10.1096/fj.04-2400fje.

De Wit-Verheggen, V. H. W., & van de Weijer, T. (2021). Changes in cardiac metabolism in prediabetes. *Biomolecules*, 11(11), 1680. doi: 10.3390/biom11111680.

Dienel, G. A. (2019). Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. *Physiological Reviews*, 99(1), 949–1045. doi: 10.1152/physrev.00062.2017

Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., & Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12222–12226. doi: 10.1073/pnas.97.22.12222.

F

Fatemi, F., Siassi, F., Qorbani, M., & Sotoudeh, G. (2020). Higher dietary fat quality is associated with lower anxiety score in women: A cross-sectional study. *Annals of General Psychiatry*, 19, 14. doi: 10.1186/s12991-020-00264-9.

- Felder-Schmittbuhl, M. P., Hicks, D., Ribelayga, C. P., & Tosini, G. (2024). Melatonin in the mammalian retina: Synthesis, mechanisms of action and neuroprotection. *Journal of Pineal Research*, 76(3), e12951. doi: 10.1111/jpi.12951.
- Ferreira de Melo, I. M., Martins Ferreira, C. G., Lima da Silva Souza, E. H., Almeida, L. L., Bezerra de Sá, F., Cavalcanti Lapa Neto, C. J., Paz de Castro, M. V., Teixeira, V. W., & Coelho Teixeira, Á. A. (2020). Melatonin regulates the expression of inflammatory cytokines, VEGF, and apoptosis in diabetic retinopathy in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 327, 109183. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109183.
- Fishbein, A. B., Knutson, K. L., & Zee, P. C. (2021). Circadian disruption and human health. *Journal of Clinical Investigation*, 131(19), e148286. doi: 10.1172/JCI148286.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114–121. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05015-1.
- Fluca, A. L., Pani, B., Janjusevic, M., Zwas, D. R., Abraham, Y., Calligaris, M., Beltrami, A. P., Campos Corgosinho, F., Marketou, M., D'Errico, S., Sinagra, G., & Aleksova, A. (2024). Unraveling the relationship among insulin resistance, IGF-1, and amyloid-beta 1-40: Is the definition of type 3 diabetes applicable in the cardiovascular field? *Life Sciences*, 352, 122911. doi: 10.1016/j.lfs.2024.122911.
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70, 5.47.1–5.47.20. doi: 10.1002/0471141755.ph0547s70.

G

- George, S. M., Lu, F., Rao, M., Leach, L. L., & Gross, J. M. (2021). The retinal pigment epithelium: Development, injury responses, and regenerative potential in mammalian and non-mammalian systems. *Progress in Retinal and Eye Research*, 85, 100969. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.100969.
- Gombert, M., & Codoñer-Franch, P. (2021). Melatonin in early nutrition: Long-term effects on cardiovascular system. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6809. doi: 10.3390/ijms22136809.
- González-Morales, D. L., Cruz, J. P. S., González-Castro, T. B., Tovilla-Zárate, C. A., Gallegos-Velázquez, J. F., Juárez-Rojop, I. E., & López-Narváez, L. (2020). Predictores de calidad de vida y diabetes mellitus tipo 1 en Latinoamérica: Revisión sistemática [Predictors of quality of life and type 1 diabetes mellitus in Latin America: Systematic review]. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 58(5), 603–611. Spanish. doi:10.24875/RMIMSS.M20000090.
- Gopalakrishnan, S., & Kannan, N. N. (2021). Only time will tell: The interplay between circadian clock and metabolism. *Chronobiology International*, 38(2), 149–167. doi: 10.1080/07420528.2020.1842436.
- Givler, D., Givler, A., Luther, P. M., Wenger, D. M., Ahmadzadeh, S., Shekoohi, S., Edinoff, A. N., Dorius, B. K., Jean Baptiste, C., Cornett, E. M., Kaye, A. M., & Kaye, A. D. (2023). Chronic administration of melatonin: Physiological and clinical considerations. *Neurology International*, 15(1), 518–533. doi: 10.3390/neurolint15010031.
- Guan, D., & Lazar, M. A. (2022). Circadian regulation of gene expression and metabolism in the liver. *Seminars in Liver Disease*, 42(2), 113–121. doi: 10.1055/a-1792-4240.

Gurel, Z., & Sheibani, N. (2018). O-Linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification: A new pathway to decode pathogenesis of diabetic retinopathy. *Clinical Science (London)*, *132*(2), 185–198. doi: 10.1042/CS20171454.

H

Hammer, S. S., Beli, E., Kady, N., Wang, Q., Wood, K., Lydic, T. A., Malek, G., Saban, D. R., Wang, X. X., Hazra, S., Levi, M., Busik, J. V., & Grant, M. B. (2017). The mechanism of diabetic retinopathy pathogenesis unifying key lipid regulators, sirtuin 1 and liver X receptor. *EBioMedicine*, *22*, 181–190. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.008.

Harreiter, J., & Roden, M. (2023). Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2023) [Diabetes mellitus: Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *135*(Suppl 1), 7–17. doi:10.1007/s00508-022-02122-y.

Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(8), 453–469. doi: 10.1038/s41583-018-0026-z.

He, R., Cui, M., Lin, H., Zhao, L., Wang, J., Chen, S., & Shao, Z. (2018). Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. *Life Sciences*, *199*, 122–130. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.020.

Hrcic, D., Mikić, J., Rasic-Markovic, A., Velimirović, M., Stojković, T., Obrenović, R., Rankov-Petrović, B., Šušić, V., Djuric, D., Petronijević, N., & Stanojlovic, O. (2016). Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: Role of the brain oxidative stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *94*(10), 1074–1082. doi: 10.1139/cjpp-2015-0581.

Hu, J., Zhang, R., Zou, H., Xie, L., Zhou, Z., & Xiao, Y. (2022). Latent autoimmune diabetes in adults (LADA): From immunopathogenesis to immunotherapy. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, *13*, 917169. doi: 10.3389/fendo.2022.917169.

Hussain, R. M., Gregori, N. Z., Ciulla, T. A., & Lam, B. L. (2018). Pharmacotherapy of retinal disease with visual cycle modulators. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *19*(5), 471–481. doi: 10.1080/14656566.2018.1448060.

I

Illiff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine*, *4*(147), 147ra111. doi:10.1126/scitranslmed.3003748.

Ishida, K., Misawa, K., Nishimura, H., Hirata, T., Yamamoto, M., & Ota, N. (2020). 5-Caffeoylquinic acid ameliorates cognitive decline and reduces A β deposition by modulating A β clearance pathways in APP/PS2 transgenic mice. *Nutrients*, *12*(2), 494. doi:10.3390/nu12020494.

Ito, M., Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K., & Naruse, A. (2001). Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *9*(3), 71–78. doi: 10.1016/s1382-6689(00)00064-8.

J

- Jiang, T., Chang, Q., Cai, J., Fan, J., Zhang, X., & Xu, G. (2016). Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3528274. doi: 10.1155/2016/3528274.
- Jidigam, V. K., Sawant, O. B., Fuller, R. D., Wilcots, K., Singh, R., Lang, R. A., & Rao, S. (2022). Neuronal Bmal1 regulates retinal angiogenesis and neovascularization in mice. *Communications Biology*, 5(1), 792. doi: 10.1038/s42003-022-03774-2.
- Jocelyn, P. C. (1987). Spectrophotometric assay of thiols. *Methods in Enzymology*, 143, 44–67. doi: 10.1016/0076-6879(87)43013-9.
- Julien-Schraermeyer, S., Illing, B., Tschulakow, A., Taubitz, T., Guezzuez, J., Burnet, M., & Schraermeyer, U. (2020). Penetration, distribution, and elimination of remofuscin/soraprazan in Stargardt mouse eyes following a single intravitreal injection using pharmacokinetics and transmission electron microscopic autoradiography: Implication for the local treatment of Stargardt's disease and dry age-related macular degeneration. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(6), e00683. doi: 10.1002/prp2.683.

K

- Kim, E., Sohn, S., Lee, M., Jung, J., Kineman, R. D., & Park, S. (2006). Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. *Journal of Endocrinology*, 188(2), 263–270. doi: 10.1677/joe.1.06501.
- Kim, N., & Priefer, R. (2021). Retinol binding protein 4 antagonists and protein synthesis inhibitors: Potential for therapeutic development. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 226, 113856. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113856.
- Kiser, P. D. (2022). Retinal pigment epithelium 65 kDa protein (RPE65): An update. *Progress in Retinal and Eye Research*, 88, 101013. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.101013.
- Klosen, P., Lapmanee, S., Schuster, C., Guardiola, B., Hicks, D., Pevet, P., & Felder-Schmittbuhl, M.P. (2019). MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *Journal of Pineal Research*, 67(1), e12575. doi: 10.1111/jpi.12575.

L

- Li, M. D., Xin, H., Yuan, Y., Yang, X., Li, H., Tian, D., Zhang, H., Zhang, Z., Han, T. L., Chen, Q., Duan, G., Ju, D., Chen, K., Deng, F., He, W.; Biological Rhythm Academic Consortium in Chongqing (BRACQ). (2021). Circadian clock-controlled checkpoints in the pathogenesis of complex disease. *Frontiers in Genetics*, 12, 721231. doi: 10.3389/fgene.2021.721231.
- Li, H., Ren, J., Li, Y., Wu, Q., & Wei, J. (2023). Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 14, 1134025. doi: 10.3389/fendo.2023.1134025.
- Lieberman, H. R., Kellogg, M. D., Kramer, F. M., Bathalon, G. P., & Leshner, L. L. (2012). Lipid and other plasma markers are associated with anxiety, depression, and fatigue. *Health Psychology*, 31(2), 210–216. doi: 10.1037/a0026499.

- Lin, K. Y., Hsieh, W. H., Lin, Y. B., Wen, C. Y., & Chang, T. J. (2021). Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes Investigation*, 12(8), 1322–1325. doi: 10.1111/jdi.13480.
- Liu, W. J., Chen, J. Y., Niu, S. R., Zheng, Y. S., Lin, S., & Hong, Y. (2023). Recent advances in the study of circadian rhythm disorders that induce diabetic retinopathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 166, 115368. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115368.
- Liu, H., Tang, J., Du, Y., Lee, C. A., Golczak, M., Muthusamy, A., Antonetti, D. A., Veenstra, A. A., Amengual, J., von Lintig, J., Palczewski, K., & Kern, T. S. (2015). Retinylamine benefits early diabetic retinopathy in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21568–21579. doi: 10.1074/jbc.M115.655555.
- Luna, R., Talanki Manjunatha, R., Bollu, B., Jhaveri, S., Avanthika, C., Reddy, N., Saha, T., & Gandhi, F. (2021). A comprehensive review of neuronal changes in diabetics. *Cureus*, 13(10), e19142. doi: 10.7759/cureus.19142.
- Lv, W. J., Liu, C., Yu, L. Z., Zhou, J. H., Li, Y., Xiong, Y., Guo, A., Chao, L. M., Qu, Q., Wei, G. W., Tang, X. G., Yin, Y. L., & Guo, S. N. (2020). Melatonin alleviates neuroinflammation and metabolic disorder in DSS-induced depression rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1241894. doi: 10.1155/2020/1241894.
- M**
- Madke, B., Prasad, K., & Kar, S. (2015). Isotretinoin-induced night blindness. *Indian Journal of Dermatology*, 60(4), 424. doi: 10.4103/0019-5154.160547.
- Madsen, B. K., Zetner, D., Møller, A. M., & Rosenberg, J. (2020). Melatonin for preoperative and postoperative anxiety in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(12), CD009861. doi: 10.1002/14651858.CD009861.pub3.
- Manza, P., Wiers, C. E., Shokri-Kojori, E., Kroll, D., Feldman, D., Schwandt, M., Wang, G. J., Tomasi, D., & Volkow, N. D. (2020). Brain network segregation and glucose energy utilization: Relevance for age-related differences in cognitive function. *Cerebral Cortex*, 30(11), 5930-5942. doi: 10.1093/cercor/bhaa167.
- Maroni, M. J., Capri, K. M., Arruda, N. L., Gelineau, R. R., Deane, H. V., Concepcion, H. A., DeCoursey, H., Monteiro De Pina, I. K., Cushman, A. V., Chasse, M. H., et al. (2020). Substrain specific behavioral responses in male C57BL/6N and C57BL/6J mice to a shortened 21-hour day and high-fat diet. *Chronobiology International*, 37(6), 809–823. doi: 10.1080/07420528.2020.1756840.
- Masood, A., Nadeem, A., Mustafa, S. J., & O'Donnell, J. M. (2008). Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(2), 369–379. doi: 10.1124/jpet.108.137208.
- Masuda, T., Wahlin, K., Wan, J., Hu, J., Maruotti, J., Yang, X., Iacovelli, J., Wolkow, N., Kist, R., Dunaief, J. L., Qian, J., Zack, D. J., & Esumi, N. (2014). Transcription factor SOX9 plays a key role in the regulation of visual cycle gene expression in the retinal pigment epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12908–12921. doi: 10.1074/jbc.M114.556738.
- Minich, D. M., Henning, M., Darley, C., Fahoum, M., Schuler, C. B., & Frame, J. (2022). Is melatonin the "next vitamin D"? A review of emerging science, clinical uses, safety, and dietary supplements. *Nutrients*, 14(19), 3934. doi: 10.3390/nu14193934.

Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175. PMID: 4623845.

Mladenović, D., Petronijević, N., Stojković, T., Velimirović, M., Jevtić, G., Hrnčić, D., Radosavljević, T., Rašić-Marković, A., Maksić, N., Djuric, D., & Stanojlović, O. (2015). Finasteride has regionally different effects on brain oxidative stress and acetylcholinesterase activity in acute thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. *PLoS ONE*, 10(8), e0134434. doi: 10.1371/journal.pone.0134434.

Molday, R. S., & Moritz, O. L. (2015). Photoreceptors at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(22), 4039–4045. doi: 10.1242/jcs.175687.

Moon, E., Kim, K., Partonen, T., & Linnaranta, O. (2022). Role of melatonin in the management of sleep and circadian disorders in the context of psychiatric illness. *Current Psychiatry Reports*, 24(11), 623–634. doi: 10.1007/s11920-022-01369-6.

Muhammad, T., Ali, T., Ikram, M., Khan, A., Alam, S. I., & Kim, M. O. (2019). Melatonin rescues oxidative stress-mediated neuroinflammation/neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 14(2), 278–294. doi: 10.1007/s11481-018-9824-3.

Muscaritoli, M. (2021). The impact of nutrients on mental health and well-being: Insights from the literature. *Frontiers in Nutrition*, 8, 656290. doi: 10.3389/fnut.2021.656290.

N

Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P. (2013). Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological Reviews*, 93(4), 1543-1562. doi: 10.1152/physrev.00011.2013.

Nakazawa, T., Takeda, M., Lewis, G. P., Cho, K. S., Jiao, J., Wilhelmsson, U., Fisher, S. K., Pekny, M., Chen, D. F., & Miller, J. W. (2007). Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(6), 2760–2768. doi: 10.1167/iovs.06-1398.

Neto, J., Jantsch, J., de Oliveira, S., Braga, M. F., Castro, L. F. D. S., Diniz, B. F., Moreira, J. C. F., Giovenardi, M., Porawski, M., & Guedes, R. P. (2021). DHA/EPA supplementation decreases anxiety-like behaviour, but it does not ameliorate metabolic profile in obese male rats. *British Journal of Nutrition*, 128(5), 964–974. doi: 10.1017/S0007114521003998.

Nguyen, L. N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M. R., Goh, E. L., & Silver, D. L. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*, 509(7501), 503–506. doi: 10.1038/nature13241.

Nicchia, G. P., Pisani, F., Simone, L., Cibelli, A., Mola, M. G., Dal Monte, M., Frigeri, A., Bagnoli, P., & Svelto, M. (2016). Glio-vascular modifications caused by Aquaporin-4 deletion in the mouse retina. *Experimental Eye Research*, 146, 259–268. doi: 10.1016/j.exer.2016.03.019.

O

Oliveira-Abreu, K., Cipolla-Neto, J., & Leal-Cardoso, J. H. (2021). Effects of melatonin on diabetic neuropathy and retinopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 100. doi: 10.3390/ijms23010100.

Oosuka, S., Kida, T., Oku, H., Horie, T., Morishita, S., Fukumoto, M., Sato, T., & Ikeda, T. (2020). Effects of an Aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, on murine diabetic retina. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2324. doi: 10.3390/ijms21072324.

P

Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127(S 01), S1–S7. doi: 10.1055/a-1018-9078.

Petrov, A. M., Astafev, A. A., Mast, N., Saadane, A., El-Darzi, N., & Pikuleva, I. A. (2019). The interplay between retinal pathways of cholesterol output and its effects on mouse retina. *Biomolecules*, 9(12), 867. doi: 10.3390/biom9120867.

Pévet, P., Balemans, M.G., Legerstee, W.C., & Vivien-Roels, B. (1980). Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and harderian gland of the golden hamster. *Journal of Neural Transmission*, 49(4), 229–245. doi: 10.1007/BF01252128.

Pradeep, S. R., & Srinivasan, K. (2018). Ameliorative influence of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and onion (*Allium cepa*) on eye lens abnormalities via modulation of crystallin proteins and polyol pathway in experimental diabetes. *Current Eye Research*, 43(9), 1108–1118. doi: 10.1080/02713683.2018.1484146.

Q

Qiu, Y., Yi, Q., Li, S., Sun, W., Ren, Z., Shen, Y., Wu, Y., Wang, Z., Xia, W., & Song, P. (2022). Transition of cardiometabolic status and the risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged and older Chinese: A national cohort study. *Journal of Diabetes Investigation*, 13(8), 1426–1437. doi: 10.1111/jdi.13805.

R

Rahangdale, S., Yeh, S. Y., Malhotra, A., & Veves, A. (2009). Therapeutic interventions and oxidative stress in diabetes. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14(1), 192–209. doi: 10.2741/3240.

Ramos, A., Correia, E. C., Izídio, G. S., & Brüske, G. R. (2003). Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*, 33(6), 657–668. doi: 10.1023/a:1026131130686.

Reiter, R. J., Sharma, R., Tan, D. X., Huang, G., de Almeida Chuffa, L. G., & Anderson, G. (2023). Melatonin modulates tumor metabolism and mitigates metastasis. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 18(4), 321–336. doi: 10.1080/17446651.2023.2237103.

Ricketts, E. J., Joyce, D. S., Rissman, A. J., Burgess, H. J., Colwell, C. S., Lack, L. C., & Gradisar, M. (2022). Electric lighting, adolescent sleep and circadian outcomes, and recommendations for improving light health. *Sleep Medicine Reviews*, 64, 101667. doi: 10.1016/j.smrv.2022.101667.

Robinson, D. G., Gallego, J. A., John, M., Hanna, L. A., Zhang, J. P., Birnbaum, M. L., Greenberg, J., Naraine, M., Peters, B. D., McNamara, R. K., Malhotra, A. K., & Szeszko, P. R. (2019). A potential role for adjunctive omega-3 polyunsaturated fatty acids for depression and anxiety symptoms in recent onset psychosis: Results from a 16-week randomized placebo-controlled trial for participants concurrently treated with risperidone. *Schizophrenia Research*, *204*, 295–303. doi: 10.1016/j.schres.2018.09.006.

Rondanelli, M., Barrile, G. C., Cavioni, A., Donati, P., Genovese, E., Mansueto, F., Mazzola, G., Patelli, Z., Pirola, M., Razza, C., Russano, S., Sivieri, C., Tartara, A., Valentini, E. M., & Perna, S. (2023). A narrative review on strategies for the reversion of prediabetes to normoglycemia: Food pyramid, physical activity, and self-monitoring innovative glucose devices. *Nutrients*, *15*(23), 4943. doi: 10.3390/nu15234943.

Roosing, S., Collin, R. W., den Hollander, A. I., Cremers, F. P., & Siemiatkowska, A. M. (2014). Prenylation defects in inherited retinal diseases. *Journal of Medical Genetics*, *51*(3), 143–151. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102138.

Rostami, F., Jaafari Suha, A., Janahmadi, M., & Hosseinmardi, N. (2024). Aquaporin-4 inhibition attenuates pentylentetrazole-induced behavioral seizures and cognitive impairments in kindled rats. *Physiology & Behavior*, *278*, 114521. doi:10.1016/j.physbeh.2024.114521.

S

Salido, E. M., Bordone, M., De Laurentiis, A., Chianelli, M., Keller Sarmiento, M. I., Dorfman, D., & Rosenstein, R. E. (2013). Therapeutic efficacy of melatonin in reducing retinal damage in an experimental model of early type 2 diabetes in rats. *Journal of Pineal Research*, *54*(2), 179–189. doi: 10.1111/jpi.12008.

Sasako, T., Yamauchi, T., & Ueki, K. (2023). Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism Journal*, *47*(2), 185–197. doi: 10.4093/dmj.2022.0325.

Saxena, G., Bharti, S., Kamat, P. K., Sharma, S., & Nath, C. (2010). Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *94*(3), 397–403. doi: 10.1016/j.pbb.2009.09.022.

Schlechtriem, C., Henderson, J. R., & Tocher, D. R. (2008). A critical assessment of different transmethylation procedures commonly employed in the fatty acid analysis of aquatic organisms. *Limnology and Oceanography: Methods*, *6*, 523–531. doi:10.4319/lom.2008.6.523.

Sears, A. E., & Palczewski, K. (2016). Lecithin: Retinol Acyltransferase: A key enzyme involved in the retinoid (visual) cycle. *Biochemistry*, *55*(22), 3082–3091. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00319.

Shao, Y., Chen, J., Li, X. R., & Ma, J. X. (2020). Detection and quantification of retinal neovascularization using BrdU incorporation. *Translational Vision Science and Technology*, *9*(9), 4. doi: 10.1167/tvst.9.9.4.

- Shivakumar, B. R., Anandatheerthavarada, H. K., & Ravindranath, V. (1991). Free radical scavenging systems in developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 9(2), 181–185. doi: 10.1016/0736-5748(91)90010-j.
- Silva, I., Silva, J., Ferreira, R., & Trigo, D. (2021). Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease. *Neurology Research and Practice*, 3(1), 5. doi:10.1186/s42466-021-00102-7.
- Smith, A. J., Duan, T., & Verkman, A. S. (2019). Aquaporin-4 reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease by remodeling peri-plaque astrocyte structure. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 74. doi:10.1186/s40478-019-0728-0.
- Sodi, A., Banfi, S., Testa, F., Della Corte, M., Passerini, I., Pelo, E., Rossi, S., Simonelli, F., & Italian IRD Working Group. (2021). RPE65-associated inherited retinal diseases: Consensus recommendations for eligibility to gene therapy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 257. doi: 10.1186/s13023-021-01868-4.
- Sousa, M., Rego, T., & Armas, J. B. (2022). Insights into the genetics and signaling pathways in maturity-onset diabetes of the young. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12910. doi: 10.3390/ijms232112910.
- Souza, C. G., Moreira, J. D., Siqueira, I. R., Pereira, A. G., Rieger, D. K., Souza, D. O., Souza, T. M., Portela, L. V., & Perry, M. L. (2007). Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*, 81(3), 198–203. doi: 10.1016/j.lfs.2007.05.001.
- Storti, F., Klee, K., Todorova, V., Steiner, R., Othman, A., van der Velde-Visser, S., Samardzija, M., Meneau, I., Barben, M., Karademir, D., Pauzulyte, V., Boye, S. L., Blaser, F., Ullmer, C., Dunaief, J. L., Hornemann, T., Rohrer, L., den Hollander, A., von Eckardstein, A., Fingerle, J., Maugeais, C., & Grimm, C. (2019). Impaired ABCA1/ABCG1-mediated lipid efflux in the mouse retinal pigment epithelium (RPE) leads to retinal degeneration. *Elife*, 8, e45100. doi: 10.7554/eLife.45100.
- Sugiuchi, H., Uji, Y., Okabe, H., Irie, T., Uekama, K., Kayahara, N., & Miyauchi, K. (1995). Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clinical chemistry*, 41(5), 717-723. PMID: 7729051.
- Sun, H., Saedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109119.
- Sweeting, A., Wong, J., Murphy, H. R., & Ross, G. P. (2022). A clinical update on gestational diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 43(5), 763–793. doi: 10.1210/edrv/bnac003.

T

- Talib, W. H., Alsayed, A. R., Abuawad, A., Daoud, S., & Mahmud, A. I. (2021). Melatonin in cancer treatment: Current knowledge and future opportunities. *Molecules*, 26(9), 2506. doi: 10.3390/molecules26092506.

- Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2020). An evolutionary view of melatonin synthesis and metabolism related to its biological functions in plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4677–4689. doi: 10.1093/jxb/eraa235.
- Tan, T. E., & Wong, T. Y. (2023). Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 13, 1077669. doi: 10.3389/fendo.2022.1077669.
- Tanprasertsuk, J., Mohn, E. S., Matthan, N. R., Lichtenstein, A. H., Barger, K., Vishwanathan, R., Johnson, M. A., Poon, L. W., & Johnson, E. J. (2019). Serum carotenoids, tocopherols, total n-3 polyunsaturated fatty acids, and n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio reflect brain concentrations in a cohort of centenarians. *The Journals of Gerontology: Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 74(3), 306–314. doi: 10.1093/gerona/gly125.
- Thakur, A., Tyagi, S., & Shekhar, N. (2019). Comorbid brain disorders associated with diabetes: Therapeutic potentials of prebiotics, probiotics, and herbal drugs. *Translational Medicine Communications*, 4, 12. doi:10.1186/s41231-019-0043-6.
- Thebeau, C., Zhang, S., Kolesnikov, A. V., Kefalov, V. J., Semenkovich, C. F., & Rajagopal, R. (2020). Light deprivation reduces the severity of experimental diabetic retinopathy. *Neurobiology of Disease*, 137, 104754. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104754.
- Tomic, D., Shaw, J. E., & Magliano, D. J. (2022). The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(9), 525–539. doi: 10.1038/s41574-022-00690-7.
- Tosini, G., & Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 272(5260), 419–421. doi: 10.1126/science.272.5260.419.
- Tsin, A., Betts-Obregon, B., & Grigsby, J. (2018). Visual cycle proteins: Structure, function, and roles in human retinal disease. *Journal of Biological Chemistry*, 293(34), 13016–13021. doi: 10.1074/jbc.AW118.003228.
- Tu, Y., Song, E., Wang, Z., Ji, N., Zhu, L., Wang, K., Sun, H., Zhang, Y., Zhu, Q., Liu, X., & Zhu, M. (2021). Melatonin attenuates oxidative stress and inflammation of Müller cells in diabetic retinopathy via activating the Sirt1 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111274. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111274.
- Tu, Y., Zhu, M., Wang, Z., Wang, K., Chen, L., Liu, W., Shi, Q., Zhao, Q., Sun, Y., Wang, X., Song, E., & Liu, X. (2020). Melatonin inhibits Müller cell activation and pro-inflammatory cytokine production via upregulating the MEG3/miR-204/Sirt1 axis in experimental diabetic retinopathy. *Journal of Cellular Physiology*, 235(11), 8724–8735. doi: 10.1002/jcp.29716.

V

- Vasović, D., Ivković, S., Živković, A., Major, T., Milašin, J., Nikolić, N., Simonović, J., Šutulović, N., Hrnčić, D., Stanojlović, O., Vesković, M., Rašić, D., & Mladenović, D. (2024). Reduced light exposure mitigates streptozotocin-induced vascular changes and gliosis in diabetic retina by an anti-inflammatory effect and increased retinal cholesterol turnover. *Chemico-Biological Interactions*, 394, 110996. doi: 10.1016/j.cbi.2024.110996.
- Vasović, D., Vesković, M., Šutulović, N., Hrnčić, D., Takić, M., Jerotić, Đ., Matić, M., Stanojlović, O., Ivković, S., Jovanović Macura, I., & Mladenović, D. (2023). Shortened daily photoperiod alleviates anxiety-like behaviour by antioxidant effect and changes serum free

fatty acid profile in diabetic rats. *Journal of Personalized Medicine*, 13(5), 744. doi: 10.3390/jpm13050744.

Verkman, A. S., Binder, D. K., Bloch, O., Auguste, K., & Papadopoulos, M. C. (2006). Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(8), 1085-1093. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.018.

Veskovic, M., Mladenovic, D., Jorgacevic, B., Stevanovic, I., de Luka, S., & Radosavljevic, T. (2015). Alpha-lipoic acid affects the oxidative stress in various brain structures in mice with methionine and choline deficiency. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 240(4),

W

Wahlefeld, A. W. (1974). Determination of serum triglycerides level. In H. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (pp. 1831–1835). Academic Press, New York. doi:10.1016/B978-0-12-091304-6.50036-7.

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. doi: 10.1038/nprot.2007.44.

Wang, Y., Wang, S., Xin, Y., Zhang, J., Wang, S., Yang, Z., & Liu, C. (2021). Hydrogen sulfide alleviates the anxiety-like and depressive-like behaviors of type 1 diabetic mice via inhibiting inflammation and ferroptosis. *Life Sciences*, 278, 119551. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119551.

Wang, Y., Ma, X., Muthuraman, P., Raja, A., Jayaraman, A., Petrukhin, K., Cioffi, C. L., Ma, J. X., & Moiseyev, G. (2022). The novel visual cycle inhibitor (\pm)-RPE65-61 protects retinal photoreceptors from light-induced degeneration. *PLoS One*, 17(10), e0269437. doi: 10.1371/journal.pone.0269437.

Wu, H., Dunnett, S., Ho, Y. S., & Chang, R. C. (2019). The role of sleep deprivation and circadian rhythm disruption as risk factors of Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 54, 100764. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100764.

Wu, Y., Fu, R., Lei, C., Deng, Y., Lou, W., Wang, L., Zheng, Y., Deng, X., Yang, S., Wang, M., Zhai, Z., Zhu, Y., Xiang, D., Hu, J., Dai, Z., & Gao, J. (2021). Estimates of type 2 diabetes mellitus burden attributable to particulate matter pollution and its 30-year change patterns: A systematic analysis of data from the global burden of disease study 2019. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 12, 689079. doi: 10.3389/fendo.2021.689079.

Wu, Y., Zhong, L., & Geng, J. (2019). Neuromyelitis optica spectrum disorder: Pathogenesis, treatment, and experimental models. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 27, 412–418. doi:10.1016/j.msard.2018.12.002.

X

Xia, G., Han, Y., Meng, F., He, Y., Srisai, D., Farias, M., Dang, M., Palmiter, R. D., Xu, Y., & Wu, Q. (2021). Reciprocal control of obesity and anxiety-depressive disorder via a GABA and serotonin neural circuit. *Molecular Psychiatry*, 26(7), 2837–2853. doi: 10.1038/s41380-021-01053-w.

Xu, Y., Wang, C., Klabnik, J. J., & O'Donnell, J. M. (2014). Novel therapeutic targets in depression and anxiety: Antioxidants as a candidate treatment. *Current Neuropharmacology*, 12(2), 108–119. doi: 10.2174/1570159X11666131120231448.

Xu, S., Akioma, M., & Yuan, Z. (2021). Relationship between circadian rhythm and brain cognitive functions. *Frontiers in Optoelectronics*, *14*(3), 278–287. doi: 10.1007/s12200-021-1090-y.

Y

Yamamoto-Kataoka, S., Shimizu, S., Yamazaki, H., Murakami, K., Nishizaki, D., Fukuhara, S., Inagaki, N., & Yamamoto, Y. (2021). Development of a preoperative prediction model for new-onset diabetes mellitus after partial pancreatectomy: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*, *100*(24), e26311. doi: 10.1097/MD.00000000000026311.

Ye, W., Luo, C., Huang, J., Li, C., Liu, Z., & Liu, F. (2022). Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *377*, e067946. doi: 10.1136/bmj-2021-067946.

Yumnamcha, T., Guerra, M., Singh, L. P., & Ibrahim, A. S. (2020). Metabolic dysregulation and neurovascular dysfunction in diabetic retinopathy. *Antioxidants (Basel)*, *9*(12), 1244. doi: 10.3390/antiox9121244.

Z

Zekavat, S. M., Lu, J., Maugeais, C., & Mazer, N. A. (2017). An in silico model of retinal cholesterol dynamics (RCD model): Insights into the pathophysiology of dry AMD. *Journal of Lipid Research*, *58*(7), 1325–1337. doi: 10.1194/jlr.M074088.

Zhang, X., Alhasani, R. H., Zhou, X., Reilly, J., Zeng, Z., Strang, N., & Shu, X. (2021). Oxysterols and retinal degeneration. *British Journal of Pharmacology*, *178*(16), 3205–3219. doi: 10.1111/bph.15391.

Zhao, W., Wang, D., & Zhao, J. (2017). Bioinformatic analysis of retinal gene function and expression in diabetic rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *14*(3), 2485–2492. doi: 10.3892/etm.2017.4805.

Zhou, X., Gan, T., Fang, G., Wang, S., Mao, Y., & Ying, C. (2018). Zeaxanthin improved diabetes-induced anxiety and depression through inhibiting inflammation in hippocampus. *Metabolic Brain Disease*, *33*(3), 705–711. doi: 10.1007/s11011-017-0179-x.

Zhu, L., Parker, M., Enemchukwu, N., Shen, M., Zhang, G., Yan, Q., Handa, J. T., Fang, L., & Fu, Y. (2020). Combination of apolipoprotein-A-I/apolipoprotein-A-I binding protein and anti-VEGF treatment overcomes anti-VEGF resistance in choroidal neovascularization in mice. *Communications Biology*, *3*(1), 386. doi: 10.1038/s42003-020-1113-z.

Zhu, X., Zhang, Y. M., Zhang, M. Y., Chen, Y. J., & Liu, Y. W. (2021). Hesperetin ameliorates diabetes-associated anxiety and depression-like behaviors in rats via activating Nrf2/ARE pathway. *Metabolic Brain Disease*, *36*(7), 1969–1983. doi: 10.1007/s11011-021-00785-6.

Zouache, M. A. (2022). Variability in retinal neuron populations and associated variations in mass transport systems of the retina in health and aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*, 778404. doi: 10.3389/fnagi.2022.778404.

PRILOZI

OBJAVLJENI REZULTATI

Radovi *in extenso* u časopisima sa JCR liste:

1. **Vasović D**, Ivković S, Živković A, Major T, Milašin J, Nikolić N, Simonović J, Šutulović N, Hrnčić D, Stanojlović O, Vesković M, Rašić D, Mladenović D. Reduced light exposure mitigates streptozotocin-induced vascular changes and gliosis in diabetic retina by an anti-inflammatory effect and increased retinal cholesterol turnover. *Chem Biol Interact.* 2024 May 1;394:110996. (**M21, IF 4.700**)

2. **Vasović D**, Vesković M, Šutulović N, Hrnčić D, Takić M, Jerotić Đ, Matić M, Stanojlović O, Ivković S, Jovanović Macura I, Mladenović D. Shortened daily photoperiod alleviates anxiety-like behaviour by antioxidant effect and changes serum free fatty acid profile in diabetic rats. *J Pers Med.* 2023;13:744. (**M22, IF 3.000**)

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

1. **Vasović D**, Mladenović D, Stanojlović O. Patogenetski mehanizmi retinopatije i neurodegeneracije u dijabetes melitusu-protektivno dejstvo melatonina. *Medicinski podmladak* 2026; 77(6) DOI 10.5937/mp77-52396

BIOGRAFIJA AUTORA

Dolika (Dragoš) Vasović rođena je 17. januara 1993. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Novom Pazaru, kao učenik generacije i nosilac diplome "Vuk Karadžić". Polaznik je Istraživačke stanice "Petnica" na programu hemije i molekularne biomedicine u periodu od 2008. do 2011. godine.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/12. godine, a završila juna 2017. godine, čime je stekla zvanje doktora medicine sa prosečnom ocenom 9,93 (devet, devedeset tri). Tokom studija bila je demonstrator na predmetima: humana genetika (2012/13., 2013/14. i 2014/15. godina), anatomija (2012/13. i 2013/14. godina), medicinska fiziologija (2013/14. godina), imunologija (2013/14. godina), patologija (2014/15. i 2015/16. godina) i farmakologija sa toksikologijom (2016/17. godina). Tokom osnovnih studija bila je članica: Komiteta za međunarodnu saradnju studenata medicine, Evropske medicinske studentske asocijacije, Studentske unije medicinara i Društva za neuronauke Srbije. Pored toga, aktivno je učestvovala u naučno-istraživačkom radu, a dobijene rezultate prezentovala je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima, za šta je više puta nagrađivana.

Nosilac je većeg broja priznanja i Pohvalnica Dekana Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za najbolje studente, od kojih posebno izdvaja i nagradu fonda "Prof. dr Vesna Starčević" za najboljeg studenta iz oblasti medicinske fiziologije 2016. godine. Bila je stipendista Fonda za mlade talente i nosilac nagrade "Dositeja" za najbolje studente završnih godina osnovnih akademskih studija u Republici Srbiji u toku školske 2016/17. godine. Dobitnik je nagrade zadužbine "Nikola Spasić" za najboljeg diplomiranog studenta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u toku školske 2016/17. godine.

Tokom jula 2017. godine boravila je na jednomesečnom usavršavanju iz oblasti oftalmologije na Univerzitetnoj klinici u Geteborgu, u organizaciji Komiteta za međunarodnu saradnju studenata medicine dok je u septembru iste godine, boravila i na jednomesečnom usavršavanju iz oblasti oftalmologije na Univerzitetnoj klinici u Hamburgu, kao stipendista Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Obavezni lekarski staž završila je u decembru 2017. godine, a stručni ispit za doktora medicine položila je u januaru 2018. godine.

Doktorske studije iz oblasti fizioloških nauka upisala je 2017. godine, dok je u aprilu 2018. godine upisala i specijalizaciju iz oblasti oftalmologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, koju je završila 17. oktobra 2022. godine, stičući zvanje lekara specijaliste oftalmologije. Master akademske studije na programu Master menadžment u sistemu zdravstvene zaštite na Medicinskom fakultetu i Fakultetu organizacionih nauka Univerziteta u Beogradu, završila je odbranom završnog master rada 30. septembra 2024. godine.

Bibliografija dr Vasović do sada broji 80 jedinica. Autor je 20 *in extenso* rada, od čega je 10 radova objavljeno u međunarodnim časopisima indeksiranim u JCR/WOS. Učestvovala je na međunarodnim (40 izvoda) i nacionalnim skupovima (20 izvoda). Za učešće na godišnjem kongresu Nemačkog oftalmološkog društva u Berlinu 2022. godine nagrađena je putnim grantom.

Svoj naučno-istraživački rad dr Vasović je započela u Laboratoriji za neurofiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan" još kao student, 2015. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Долика Васовић**

Број индекса: **5102/17**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај скраћеног дневног излагања светлости на бихејвиоралне, биохемијске и молекуларне промене у мозгу и ретини на експерименталном моделу дијабетес мелитуса“

- 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, 28.1.2025. године

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора **Долика Васовић**

Број индекса **5102/17**

Студијски програм: Докторске студије из медицинских наука - смер Физиолошке науке

Наслов рада: „Утицај скраћеног дневног излагања светлости на бихејвиоралне, биохемијске и молекуларне промене у мозгу и ретини на експерименталном моделу дијабетес мелитуса“

Ментори: проф. др Душан Младеновић, проф. др Оливера Станојловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, 28.1.2025. године

Изјава о коришћењу

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

„Утицај скраћеног дневног излагања светлости на бихејвиоралне, биохемијске и молекуларне промене у мозгу и ретини на експерименталном моделу дијабетес мелитуса“

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, 28.1.2025. године

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 јавносаопштавање 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.