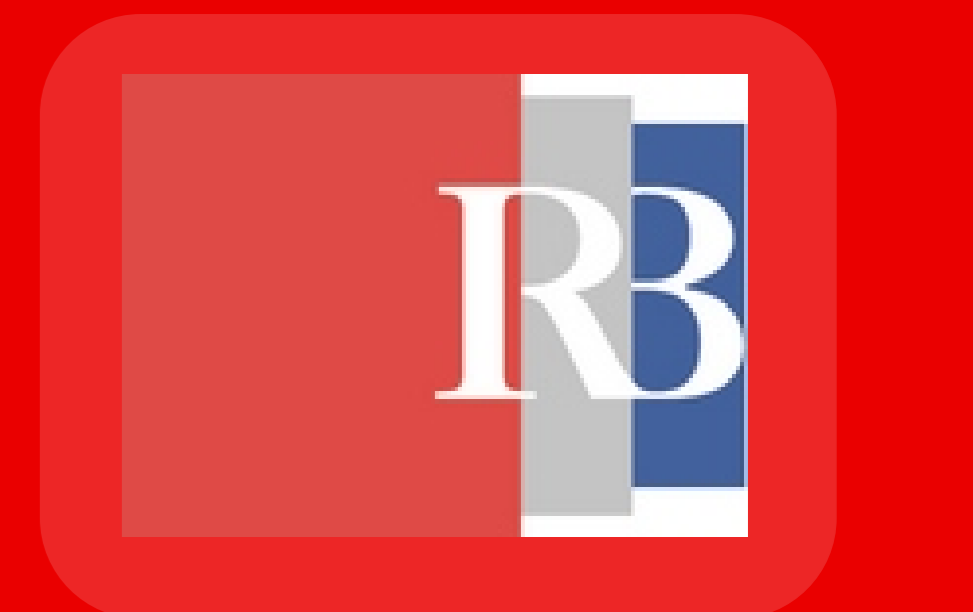


# ČOVJEK (od stanice do organizma)

## DIJABETIČKA EMBRIOPATIJA I OKSIDACIJSKI STRES

M. Korolija<sup>1</sup>, Ž. Mačak Šafranko<sup>2</sup>, A. Šarić<sup>2</sup>

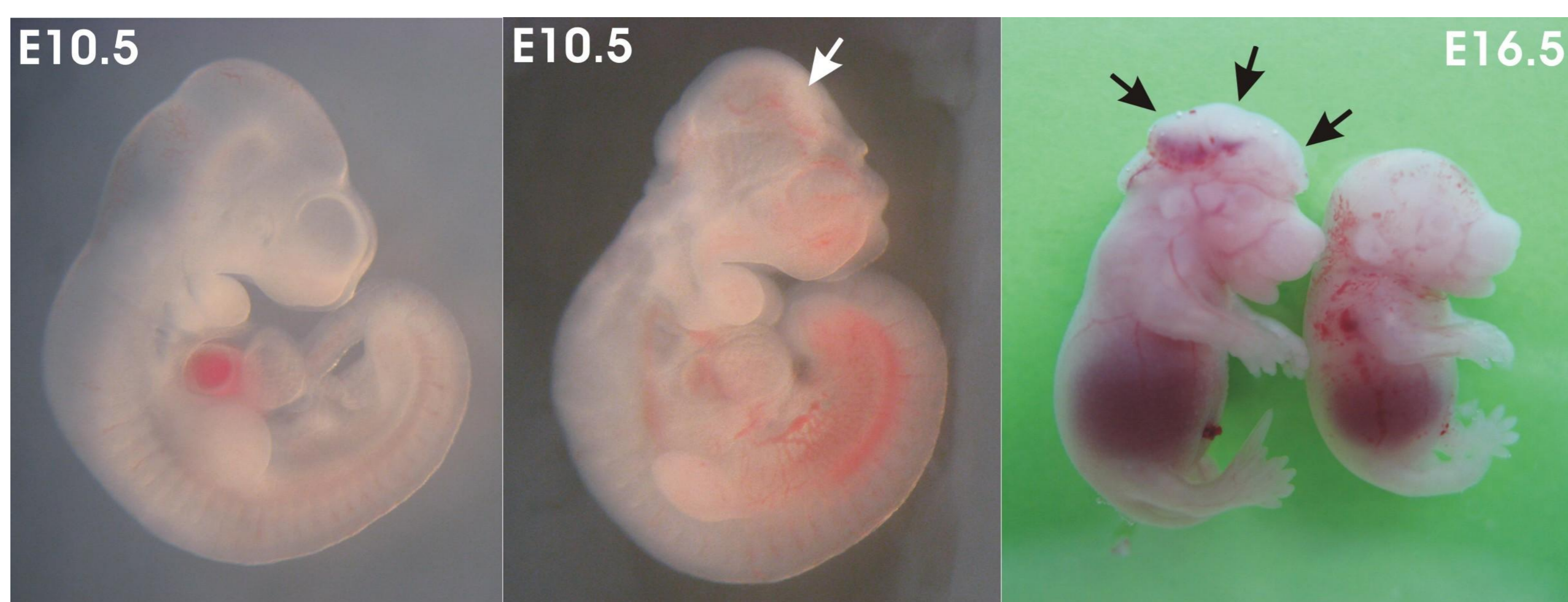
<sup>1</sup>Zavod za Molekularnu medicinu/LMET, <sup>2</sup>Zavod za Molekularnu medicinu/LARRA



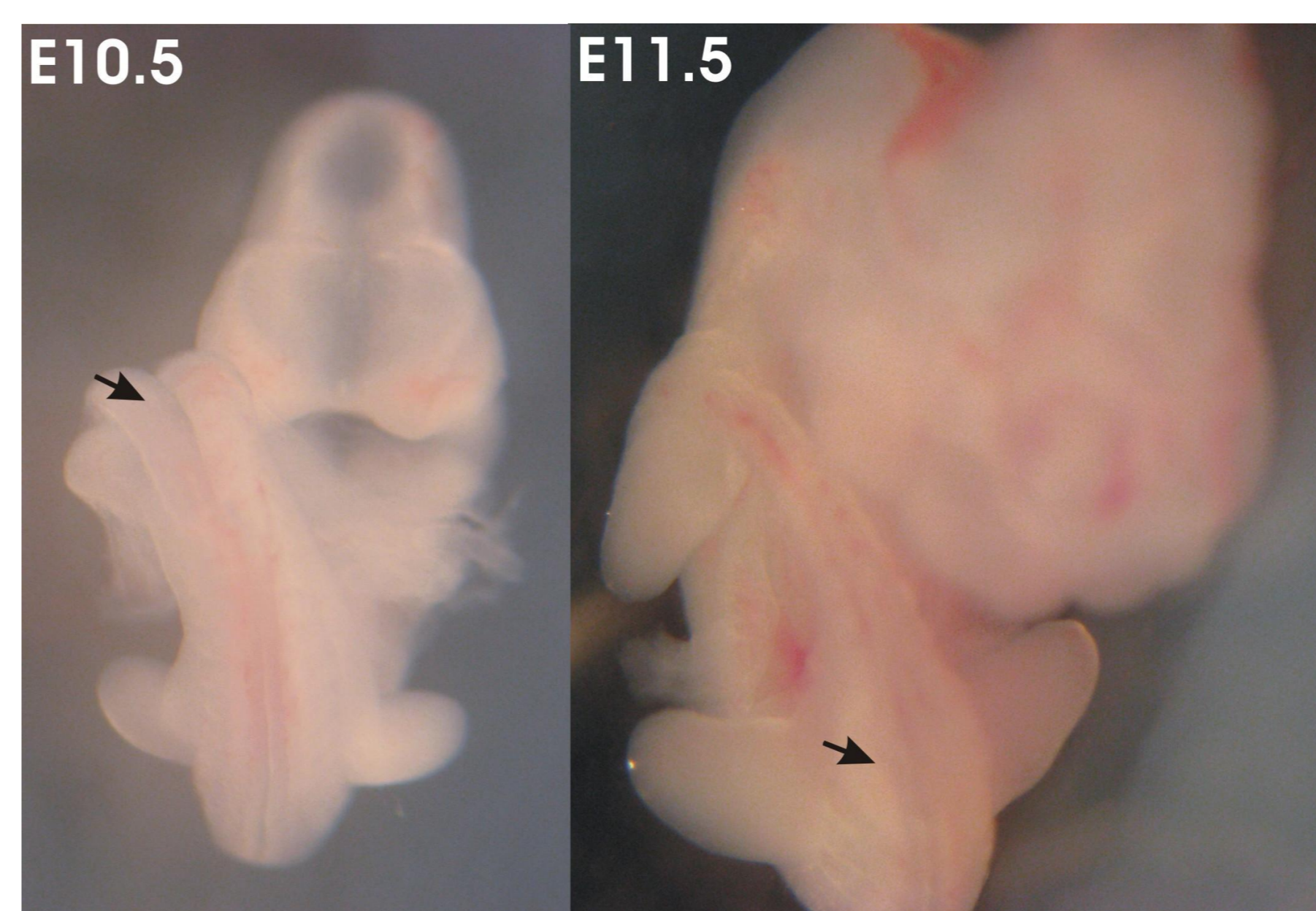
**UVOD** Dijabetes majke povećava stopu malformacija u zametku, uzrokujući dijabetičku embriopatiju koja uglavnom zahvaća srce i neuralnu cijev. Pomoću *Non-obese diabetic* (NOD) soja miševa uspostavili smo animalni model u svrhu određivanja učestalosti oštećenja neuralne cijevi (ONC). Analizirana je vanjska morfologija zametaka starih 10,5 dana (E10,5) izoliranih iz zdravih i aloksanom-induciranih dijabetičkih trudnoća. Egzencefalija je najučestalije oštećenje koje pogađa gotovo 10% svih zametaka koji se razvijaju u uvjetima visoke koncentracije glukoze.

Stanični i molekularni mehanizmi dijabetičke embriopatije do danas su nedovoljno razjašnjeni. Poznato je međutim da hiperglikemija majke uzrokuje oksidacijski stres u embriju. Stoga smo istražili ekspresiju i aktivnost glavnih antioksidacijskih enzima koji neutraliziraju superoksidni anion (CuZn-superoksid dizmutaza - Sod1, Mn-superoksid dismutaza - Sod2) a zatim razgrađuju vodikov peroksid nastao u prethodnoj reakciji (katalaza - Cat, glutation peroksidaza 1 - Gpx1) u E10,5 zamecima normalne morfologije iz zdravih trudnoća te zamecima normalne morfologije i zamecima pogođenim egzencefalijom iz dijabetičkih trudnoća.

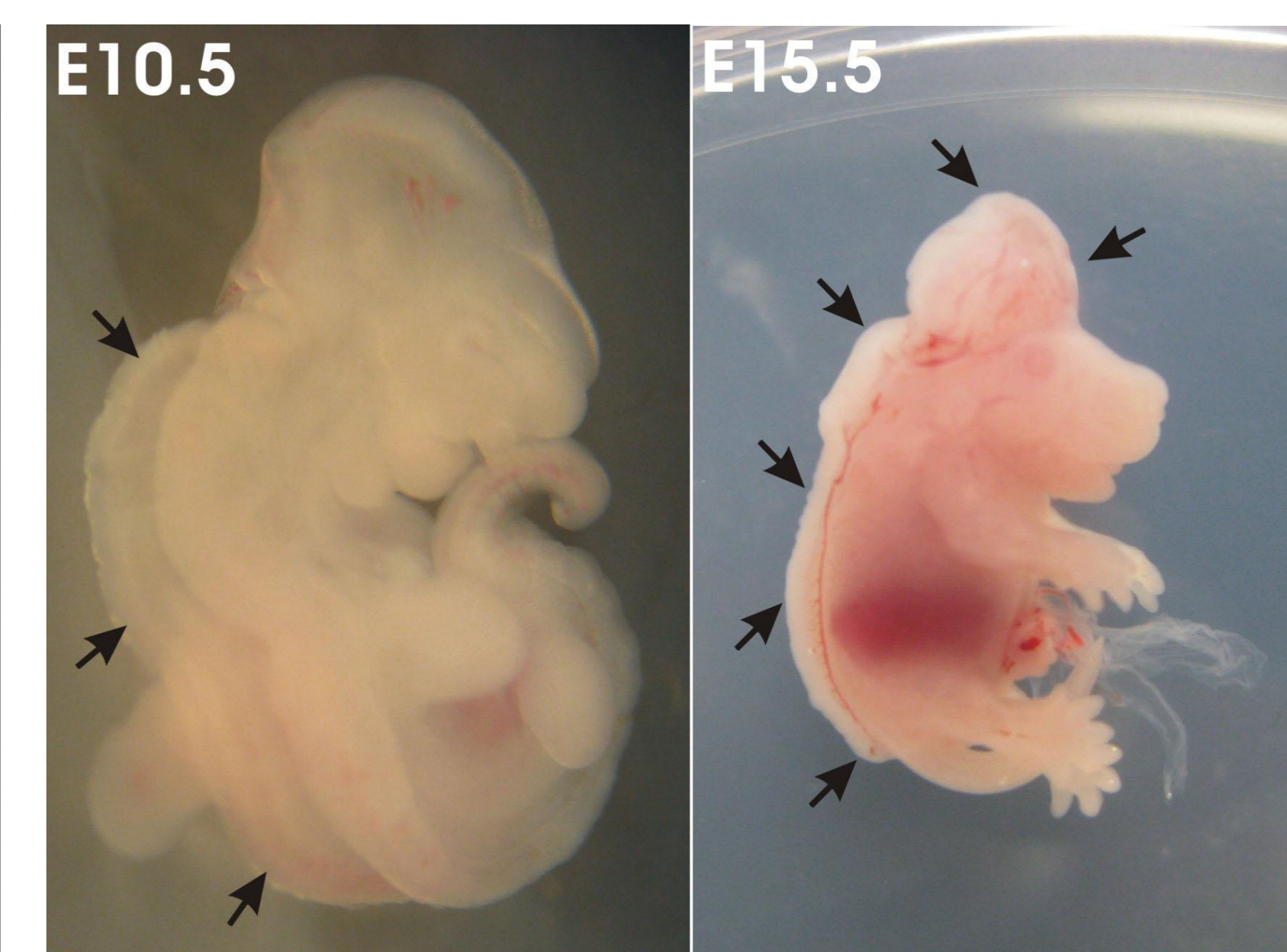
### REZULTATI



**Slika 1.** Zametak normalne vanjske morfologije (lijevo), zametak s egzencefalijom (u sredini), fetus iz istog legla sa i bez egzencefalije (desno); bijela strelica označava nefuzionirani neuralni nabor glave; crne strelice označavaju slobodno-stršeće moždano tkivo kod egzencefalije



**Slika 2.** Zametak pogođen spinom bifidom, pogled s ventralne strane (strelice označavaju nefuzionirani spinalni neuralni nabor)

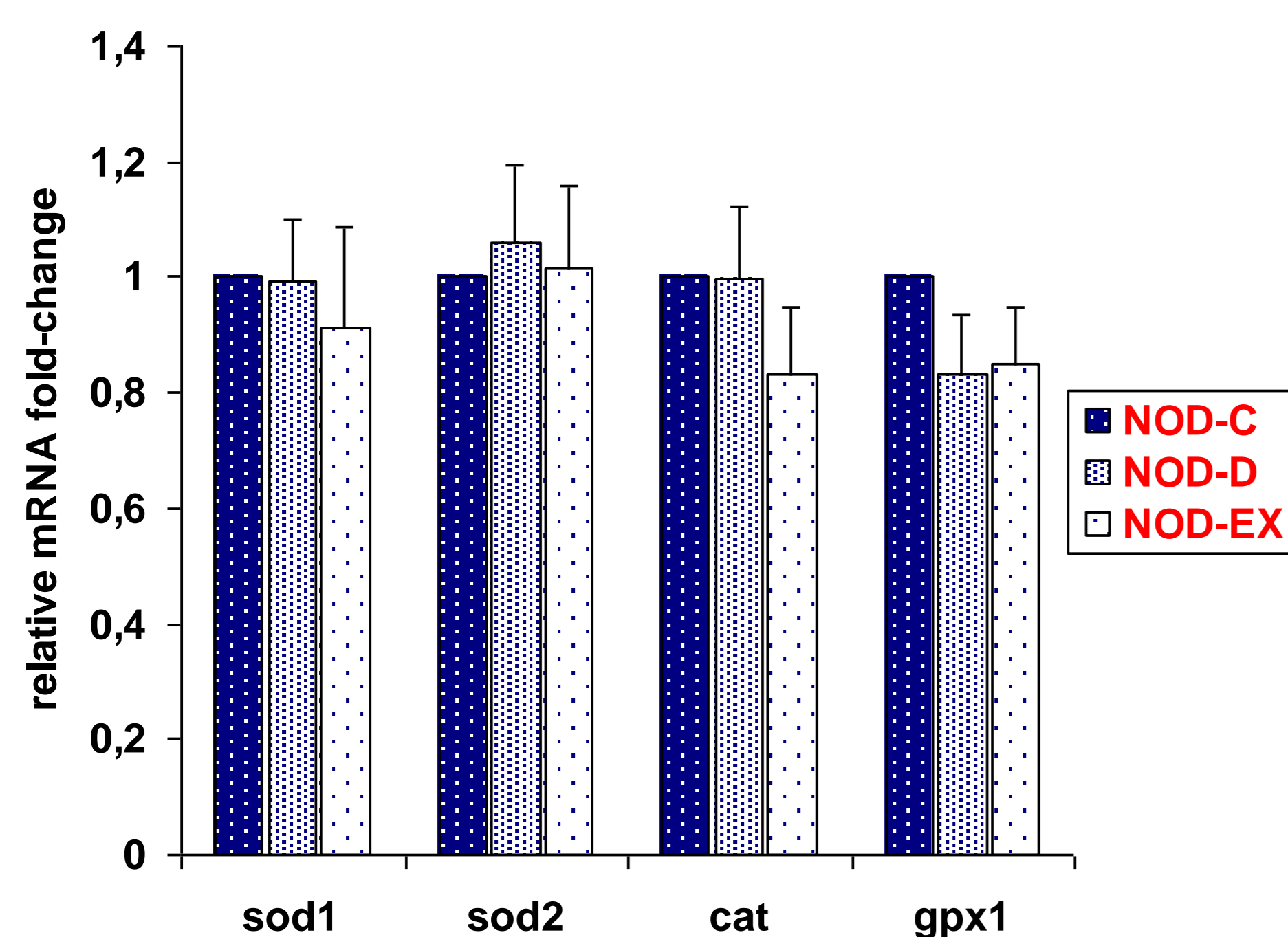


**Slika 3.** Embrij (lijevo) i fetus (desno) pogođen kraniorahišizom; strelice označavaju neuralni nabor potpuno otvorene neuralne cijevi iz koje izlaze mozak i leđna moždina (desno)

**Tablica 1.** Glikemijski status i masa kontrolnih i dijabetičkih NOD ženki tijekom trudnoće; učinak na E10.5 zametke

Pokusna skupina	Ženke (n)	Početna razina glukoze (mM)	Konačna razina glukoze (mM)	Dobivena masa (Δg)	Zameci (n)	Zameci po leglu	Dužina CR (mm) <sup>a</sup>	Broj somita <sup>a</sup>	Normalni zameci (%)	Malformirani zameci (%)	Zameci s ONC <sup>b</sup> (%)	Resorbirani zameci (%)
KONTROLA	15	6,33 ± 0,19	8,31 ± 0,79	4,33 ± 0,38	156	10,40 ± 0,29	4,99 ± 0,09	30,76 ± 0,39	85,3 ± 5,03	5,09 ± 3,25	0	9,61 ± 3,21
DIJABETES	15	19,17 ± 0,77**	34,13 ± 3,63**	3,20 ± 0,25*	158	10,53 ± 0,32	5,08 ± 0,15	31,73 ± 0,66	69,6 ± 8,59	6,93 ± 3,29	14,52 ± 2,68**	8,83 ± 4,75

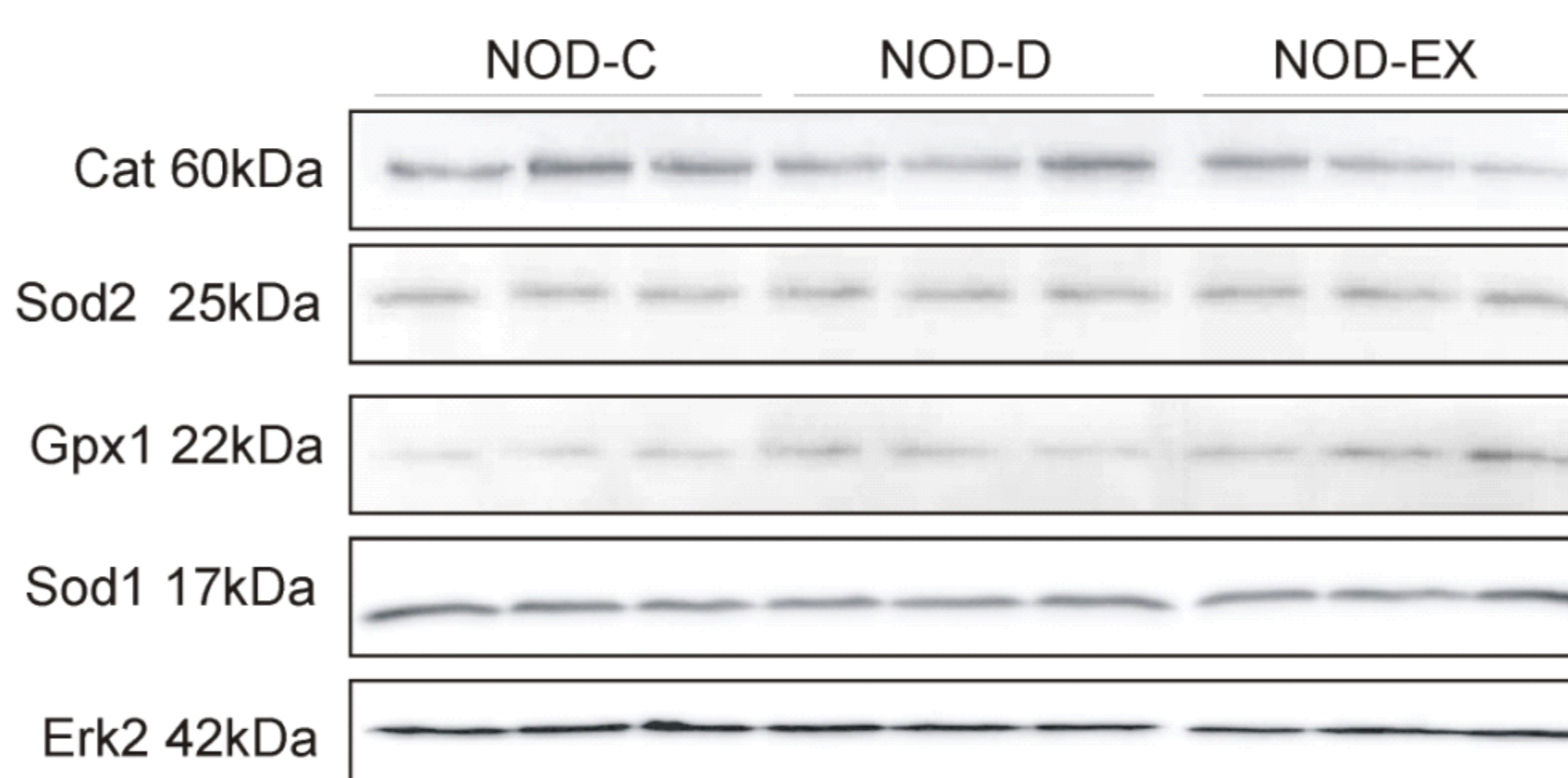
Razlike između skupina izračunate pomoću Studentovog t-testa. Postotak normalnih, malformiranih i resorbiranih zametaka je uspoređen pomoću χ<sup>2</sup> testa. Vrijednosti izražene kao srednja vrijednost ± SEM. \* p < 0,05; \*\* p < 0,001 kontrola u usporedbi s dijabetesom; <sup>a</sup> zameci bez vidljivih vanjskih anomalija; <sup>b</sup> ONC uključuju 17 slučajeva egzencefalije, 2 slučaja spine bifide i 4 slučaja kraniorahišize.



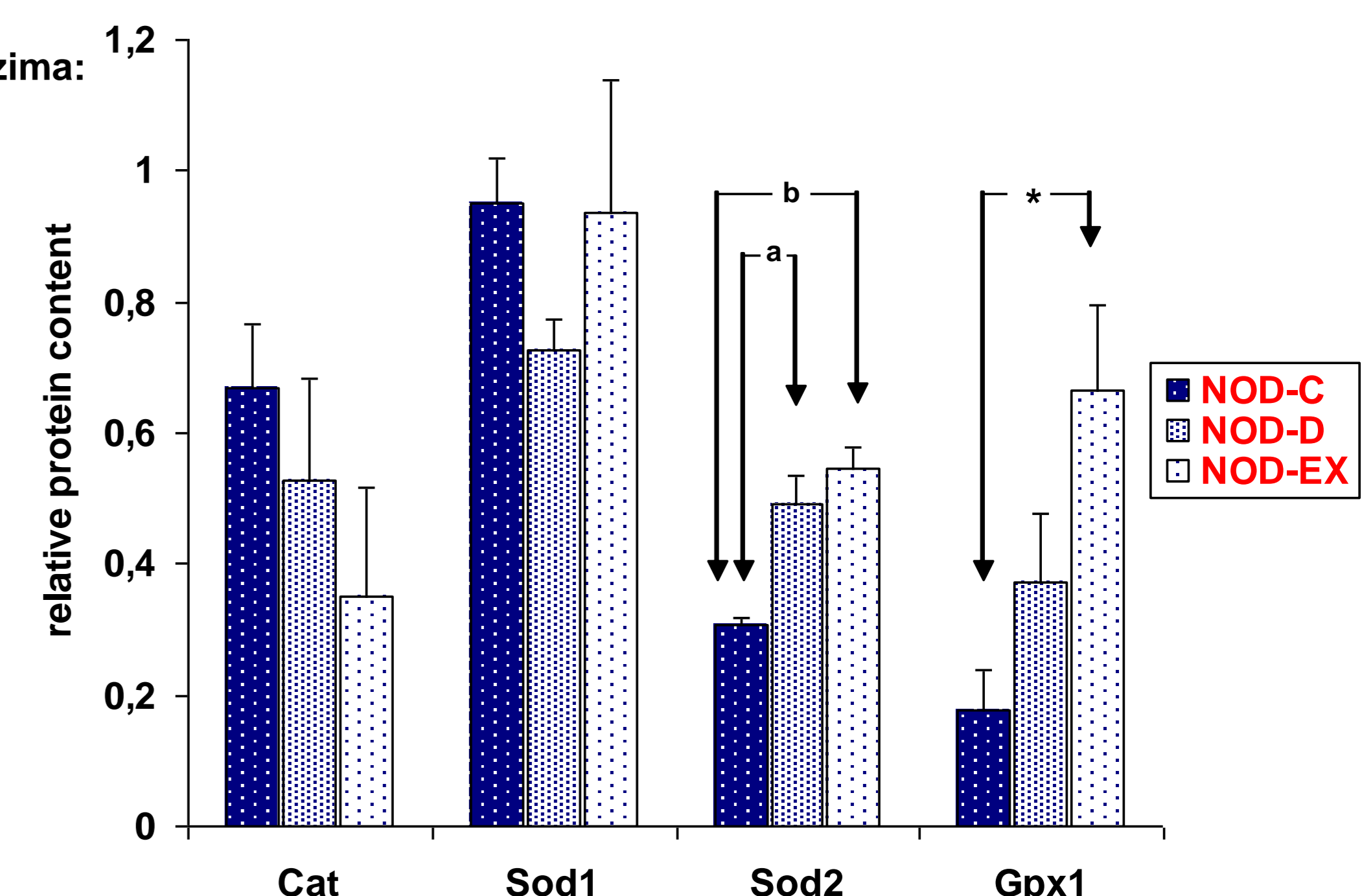
**Slika 4.** Rezultati RT-PCR analize (srednja vrijednost ± SEM) četiri pojedinačna embrija po grupi. Relativna promjena u odnosu na kontrolu (koja je definirana kao 1) izračunata komparativnom ΔΔCt metodom. Beta-aktin korišten kao unutrašnja kontrola.

Grupe zametaka korištene za analizu ekspresije gena/proteina te aktivnost enzima:

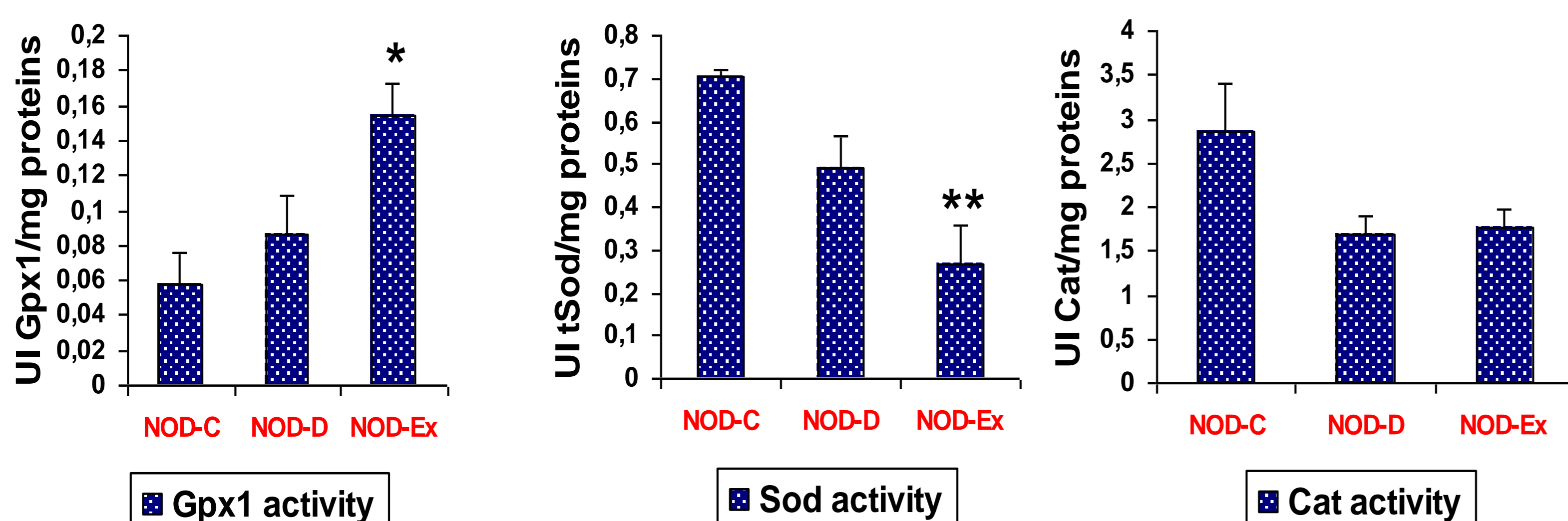
- NOD-C bez vidljivih vanjskih anomalija, od nedijabetičkih ženki
- NOD-D bez vidljivih vanjskih anomalija, od dijabetičkih ženki
- NOD-EX sa egzencefalijom, od dijabetičkih ženki



**Slika 5a.** "Western blot" analiza antioksidacijskih enzima tri grupe od po dva udružena zametka. Erk2 protein korišten kao unutrašnja kontrola.



**Slika 5b.** Rezultati WB analize (srednja vrijednost ± SEM) statistički obrađene jednostrukom analizom varijance (ANOVA) prije Dunnetovog post-hoc testa. <sup>a</sup> p = 0.013; <sup>b</sup> p = 0.004; \* p = 0.028



**Slika 6.** Enzimski aktivnost istih uzoraka prikazanih na Slici 5a. Rezultati (srednja vrijednost ± SEM) su obrađeni jednostrukom analizom varijance (ANOVA), prije Dunnetovog post-hoc testa. \* p = 0.024 (NOD-C vs. NOD-EX); \*\* p = 0.008 (NOD-C vs. NOD-EX)

### ZAKLJUČAK

Dijabetes u majke uzrokuje oštećenja neuralne cijevi, uglavnom egzencefaliju, te utječe na koncentraciju i aktivnost antioksidacijskih enzima. Smanjena aktivnost Sod enzima u zamecima pogođenim egzencefalijom upućuje na smanjenu sposobnost zametka za degradaciju superoksidnog aniona. S druge strane, istovremeno povećanje koncentracije i aktivnosti Gpx1 enzima ukazuje na povećanu detoksifikaciju vodikovog peroksida. Postupna promjena aktivnosti antioksidacijskih enzima zametaka koji potječu iz dijabetičkih trudnoća a normalne su morfologije u usporedbi s zamecima iz kontrolne skupine, ukazuje da malformacije nastaju nakon prelaska određenog praga oksidacijskog stresa.