

Učinak umjetnih sladila na inzulinski signalni put stanica ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y

Čović, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:199316>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
STUDIJ MEDICINE

Marina Čović

UČINAK UMJETNIH SLADILA NA
INZULINSKI SIGNALNI PUT STANICA
LJUDSKOG NEUROBLASTOMA
SH-SY5Y

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
STUDIJ MEDICINE

Marina Čović

UČINAK UMJETNIH SLADILA NA
INZULINSKI SIGNALNI PUT STANICA
LJUDSKOG NEUROBLASTOMA
SH-SY5Y

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Mentor rada je prof. dr. sc. Marija Heffer.

Neposredni voditelj rada je dr. sc. Milorad Zjalić.

Rad ima 94 lista, 35 tablica i 3 slike.

Hvala Ti Gospodine što si mi dao snagu, hrabrost i odlučnost u proteklim
godinama!

Zahvaljujem svojoj obitelji što su mi bili oslonac i nada u svakom trenutku života, a
posebice tijekom studiranja.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer na pomoći i podršci tijekom
izrade ovoga rada.

Zahvaljujem dr. sc. Miloradu Zjaliću na iznimnom strpljenju, podršci i vremenu
tijekom istraživanja i izrade ovoga rada.

Zahvaljujem Dariji, Neni, Ediju, Vjeri i Tei na nezaboravnim laboratorijskim
trenucima.

*Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima zbog njihove
bezuwjetne ljubavi, vječne podrške i neprocjenjivog
odricanja!*

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Neurodegenerativne bolesti.....	1
1.1.1 Uloga inzulina u neurodegenerativnim bolestima.....	1
1.1.2 Levodopa.....	2
1.2 Stanična linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y	2
1.3 Inzulin i inzulinski signalni put.....	2
1.4 Umjetni zaslađivači	3
1.4.1 Sukraloza.....	4
1.4.2 Natrijev ciklamat	5
2. Hipoteza	6
3. Ciljevi	7
4. Materijali i metode	8
4.1 Ustroj studije	8
4.2 Materijali	8
4.2.1 Stanična linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y	8
4.3 Metode.....	8
4.3.1 Uzgoj i diferencijacija stanica	8
4.3.2 Tretmani	8
4.3.3 Stanično preživljenje MTT test	9
4.3.4 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	9
4.3.5 Elektroforeza i Western blot metoda.....	9
4.3.6 MALDI-TOF MS metoda	12
4.4 Statističke metode	12

5.	Rezultati	13
5.1	Stanično preživljenje, MTT test	13
5.1.1	Sukraloza.....	13
5.1.2	Natrijev ciklamat	18
5.2	Western blot analiza proteina	22
5.2.1	Sukraloza.....	23
5.2.2	Natrijev ciklamat	42
5.3	MALDI-TOF MS analiza.....	59
5.3.1	Sukraloza.....	59
5.3.2	Natrijev ciklamat	59
6.	Rasprava	62
7.	Zaključci.....	70
8.	Sažetak	71
9.	Summary	72
10.	Literatura	73
11.	Životopis.....	87

Popis kratica

AB	Alzheimerova bolest
Akt	protein kinaza B
A β 42	amiloid-beta
FBS	fetalni goveđi seruma
FDR	engl. <i>false discovery rate</i>
GLP-1	glukagonu sličan peptid 1
GSK3 α	glikogen sintaza kinaza 3 alfa
GSK3 β	glikogen sintaza kinaza 3 beta
IGF-1	inzulinu sličan faktor rasta 1
IGF1R β	receptor za inzulinu sličan faktor rasta beta
IR	inzulinski receptor
IRS	supstrat inzulinskog receptora
LD	levodopa
MALDI-TOF-MS	engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MAPK	protein kinaze aktivirana mitogenom
mTOR	engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>
pAkt	fosforilirana protein kinaza B
pGSK3 α	fosforilirana glikogen sintaza kinaza 3 alfa
pGSK3 β	fosforilirana glikogen sintaza kinaza 3 beta
PB	Parkinsonova bolest
PI3K	fosfoinozimid 3-kinaza
PIP3	fosfatidilinozitol (3,4,5) -trisfosfat
SDS	engl. <i>sodium dodecyl-sulfate</i>
SŽS	središnji živčani sustav

1. Uvod

1.1 Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti predstavljaju sve veći zdravstveni problem u populacijama zemalja razvijenog svijeta (1). Rizik od razvoja Alzheimerove (AB) i Parkinsonove bolesti (PB) povećavaju moždani udar, kardiovaskularne bolesti, hiperlipidemija, dijabetes, pretilost, traumatske ozljede mozga, pušenje i prisutnost alela ApoE ϵ 4 (2–10). Patofiziološki mehanizam u svim ovim stanjima uključuje inzulinsku signalnu mrežu i apoptozu neurona (10). AB djelomično je uzrokovana neuroinflamacijom, vaskulopatijom i inzulinskom rezistencijom u osoba koje imaju perifernu inzulinsku rezistenciju uključujući metabolički sindrom (11,12). Proces neurodegeneracije se očituje neuroinflamacijom, imunoreaktivnošću ubikvitina u degenerirajućim neuronima, atrofijom kortikalne, bijele tvari i medijalnih temporalnih struktura, mikrovaskularnom bolešću, nakupljanjem hiperfosforiliranog tau proteina i amiloid-beta ($A\beta$ 42) naslaga u plakovima, žilama i neuronima (13–16).

1.1.1 Uloga inzulina u neurodegenerativnim bolestima

Inzulin i inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1) putem svojih receptora (IR; IGF1R) reguliraju preživljavanje te plastičnost neurona i oligodendroglije. Potonji se eksprimiraju u moždanim regijama koje su vrlo osjetljive na proces neurodegeneracije (17). U ranim i srednjim stadijima razvoja AB, razine inzulina u mozgu i likvoru su smanjene što upućuje na inzulinsku rezistenciju (18). Uočeno je da intranazalna primjena inzulina poboljšava memoriju i kognitivne sposobnosti te i povećava uklanjanje $A\beta$ 42 iz mozga (19,20). PB je neurodegenerativna poremećaj uzrokovan progresivnim propadanjem dopaminergičkih neurona substantije nigre srednjeg mozga. Dostupno je nekoliko istraživanja koji pokazuju da je inzulinska rezistencija povezana s PB (10,21). Snažan dokaz da za neurone srednjeg mozga, osobito substantije nigre, inzulin ima veliku ulogu jest postojanje umjerene do visoka gustoće inzulinskih receptora (IR) u tom području (22,23). Inzulin ima regulatorne učinke na ekspresiju i aktivnost enzima tirozin-hidroksilaze (24). Ovaj enzim ograničava brzinu biosinteze dopamina, a odgovoran za reakciju pretvorbe L-tirozina u L-3,4-dihidroksifenilalanin (levodopa). Dobro je poznato da je aktivnost tirozin-hidroksilaze, a time i razina dopamina, smanjena u PB. Inzulin u mozgu pojačava ekspresiju transportera dopamina i potiče uklanjanje dopamina iz sinapsi u ventralnom tegmentumu štakora i substantiji nigri (25,26).

1. 1. 2 Levodopa

Levodopa je farmakološki „zlatni standard“ za liječenje PB. Levodopa ulazi u središnji živčani sustav pomoću transportera L-aminokiselina, gdje se dekarboksilira u dopamin (27). Najčešće se koristi u kombinaciji s karbidopom kako bi se povećala bioraspoloživost lijeka u mozgu. Kombinacija levodope i karbidope potencijalno povećava rizik nastanka periferne inzulinske rezistencije tako što smanjuje koncentraciju glikogena, aktivnost glikogen sintaze i inzulinom stimuliran transport glukoze u skeletnim mišićima štakora (28).

1. 2 Stanična linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

Stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y komercijalno je dostupan *in vitro* model za istraživanja neurodegenerativnih bolesti. Stanice ove linije, nakon diferencijacije retinoičnom kiselinom, razvijaju dopaminergički fenotip i osjetljive su na tretman dopaminom i njegovim prekursorima (29). Ove stanice posjeduju aktivan inzulinski signalni put što ih čini povoljnima za istraživanje potencijalnih modulatora aktivnosti inzulinske signalizacije (30).

1. 3 Inzulin i inzulinski signalni put

Inzulin je peptidni hormon kojeg luče beta stanice gušterače primarno u svrhu održavanja euglikemije, a sekundarno u svrhu regulacije metabolizma stanice (31,32). Inzulin se sastoji dva peptidna lanca, A i B, međusobno povezanih disulfidnim vezama. S obzirom na to da ne prolazi staničnu membranu, svoje djelovanje ostvaruje putem dimernog transmembranskog tirozin-kinaznog receptora (33). Inzulin, inzulinu sličan čimbenik rasta 1 i 2 su supstrati za inzulinski receptor i receptor faktora rasta sličan inzulinu 1 (IR; IGF1R). IR se aktivira poprečnim povezivanjem disulfidnim vezama dviju izvanstaničnih alfa podjedinica na koje se najprije vežu dvije molekule inzulina na domene bogate leucinom, a zatim još dvije za domene fibronektina I i II. Beta podjedinice su transmembranski proteini, a većim svojim dijelom se nalaze unutar stanice. Vezanjem četiriju molekula inzulina na receptor i približavanjem monomera dolazi do transfosforilacije tirozinskih ostataka i aktivacije nizvodne signalne kaskade koja obuhvaća niz različitih puteva koji utječu na stanični metabolizam i preživljenje. Prvi put u citoplazmatskom prijenosu signala je fosforilacija i aktivacija proteina supstrata inzulinskog receptora (IRS). Danas su poznate četiri izoforme IRS proteina koja se razlikuju po mjestu i načinu djelovanja. IRS-1 je eksprimiran u većini stanica te regulira rast tijela, a najvećim dijelom je odgovoran za inzulinski

odgovor u stanicama skeletnih mišića. S druge strane, ekspresija IRS-2 ograničena je na specifična tkiva poput neurona, stanica otočića gušterače, preadipocita i hepatocita u kojima regulira rast i održava pravilnu funkciju stanica. IRS-3 i IRS-4 proteini su pronađeni kod glodavaca. Kod ljudi se IRS-4 protein se nalazi samo u određenim tumorima dojke. Stoga su samo IRS-1 i -2 bitni za inzulinsku signalizaciju u većini ljudskih stanica (34). Regulacija aktivnosti IRS-a uglavnom se oslanja na njegovu fosforilaciju kojom se aktivira put protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK-ERK) i put protein kinaze B (Akt). Aktivacija MAPK kaskade rezultira povećanom sintezom proteina. MAPK-ERK put aktivira ERK1/2, što će na kraju dovesti do inaktivacije IRS1 fosforilacijom ostataka Ser312 i Ser616 što dovodi do djelomičnog gašenja inzulinskog signala (16, 17). S druge strane, IRS-1 se veže na fosfoinozimid 3-kinazu (PI3K) koja katalizira nastanak fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfata (PIP3). Zatim, PIP3 fosforilacijom na Ser308 aktivira protein-kinazu B (pAkt). pAkt čini glavno signalno središte za mnoge stanične puteve poput autofagije, transkripcije gena, translacije proteina, inhibicije apoptoze i regulacije unosa glukoze translokacijom GLUT4 transportera. Jedan od bitnijih učinaka pAkt puta je inaktivacija glikogen sintaza kinaze-3 (GSK3) što omogućuje glikogen sintazi da započne taloženje glikogena u stanicama. Inaktivacija GSK3 β za posljedicu ima njegovo drugu katalitičku aktivnost, a to je fosforilaciju IRS-1 čime se slabi signalna kaskada (37). PIP3 potiče aktivaciju mTOR puta (engl. *mammalian target of rapamycin*) koji igra važnu ulogu u sintezi proteina, potencijalno lipida i potiskuje autofagiju u središnjem živčanom sustavu (SŽS) (38). Prema svemu navedenom može se uvidjeti da je inzulinski signalni put zapravo vrlo važna metabolička mreža zato postoje mnoge regulatorne točke koje sprečavaju da signal izmakne kontroli. Poremećaj nekih od regulatornih točaka inzulinskog signalnog puta zasigurno za posljedicu ima nastanak inzulinske rezistencije koja je podloga mnogim kroničnim bolestima.

1. 4 Umjetni zaslađivači

Umjetni zaslađivači su funkcionalni aditivi koji daju slatkoću hrani i piću, a sadržavaju zanemarive vrijednosti kalorija (39). Neki od umjetnih zaslađivača koji su trenutno odobreni od strane Svjetske zdravstvene organizacije kao izravni aditivi u hrani i piću su: acesulfam-K (E950), aspartam (E951), ciklamat (E952), saharin (E954), sukraloza (E955) i steviol glikozidi (E960). Prehrambena industrija koristi umjetne zaslađivače u širokom rasponu hrane i pića kao alternativu dodanim šećerima koji su odgovorni za razvoj kroničnih bolesti (40). Unatoč korištenju u prevenciji kroničnih bolesti, umjetna sladila imaju potencijal za remećenje stabilnosti periferne

inzulinske signalne mreže čime stvaraju podlogu za razvoj upravo onih kroničnih bolesti koje bi trebali spriječiti (41). Studija na štakorima sugerira da kronični unos aspartama, saharina i sukraloze, može narušiti kognitivne funkcije i građu hipokampusa (42). Osobe koje kronično konzumiraju acesulfam-K i saharin mogu imati povećan rizik za nastanak kognitivnih poremećaja prikazanoj je u dugoročnoj prospektivnoj studiji (43).

Ako se uzme u obzir opaženi učinak da umjetni zaslađivači u kroničnoj konzumaciji izazivaju blaži oblik periferne inzulinske rezistencije, za pretpostaviti je da to čine kroz unutarstanični metabolizam. Kronična aktivacija inzulinskog signalnog puta konačno dovodi do utišavanja signalnog puta i povlačenja inzulinskog receptora s membrane. Slično, poremećaj inzulinske signalne mreže u neuronima, kod kroničnih neurodegenerativnih bolesti, sprječava aktivaciju inzulinske signalne kaskade - što kao posljedicu ima apoptozu neurona. Postavlja se pitanje, mogu li umjetni zaslađivači samostalno ili u kombinaciji s inzulinom i levodopom, poslužiti kao direktni stimulatori inzulinskog signalnog puta ili ih treba izbjegavati kod pacijenata s neurodegenerativnim bolestima.

1. 4. 1 Sukraloza

Sukraloza je slučajno sintetizirana 1976. godine u britanskoj tvrtki za preradu šećera *Tate & Lyle*. Ovaj se disaharid proizvodi od saharoze postupkom koji zamjenjuje tri hidroksilne skupine saharoze s tri atoma klora (44). Sukraloza je oko 600 puta slađa od saharoze pa zato ima minimalan sadržaj kalorija u odnosu na ekvivalentnu količinu stolnog šećera (45). Američka agencija za hranu i lijekove je na temelju pregleda više od 110 studija na ljudima i životinjama zaključila da sukraloza ne predstavlja karcinogeni, neurološki ili reproduktivni rizik po zdravlje čovjeka (46). Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji prihvatljiv dnevni unos za sukralozu iznosi 15 mg/kg tjelesne mase (47,48). Sukraloza je komercijalno dostupna od 1988. godine pod imenom Splenda®. Sasvim neočekivano, upotreba sukraloze kroz deset tjedna dovela je do značajnog povišenja serumskog inzulina kod zdravih mladih pojedinaca što se nije trebalo dogoditi prema početnim studijama (49). Sukraloza može utjecati na regulaciju tjelesne mase putem interakcije s receptorima slatkog okusa mijenjajući njihovu ekspresiju u hipotalamusu glodavaca i povećavanjem lučenja inzulina putem istih na β stanicama gušterače kod miševa (50,51).

Glukagonu sličan peptida-1 (GLP-1) se luči u crijevima, a ima nekoliko fiziološki bitnih funkcija: inducira stvaranje inzulina ovisno o glukozi u gušterači, odgađa pražnjenje želuca time

povećava osjećaj sitosti i smanjuje lučenje glukagona u jetri. Samo sukraloza je potaknula oslobađanje GLP-1 *in vitro*, a u kombinaciji s acesulfam-K povećalo se lučenje GLP-1 kod zdravih osoba kao i kod osoba s dijabetesom tipa 2 (52,53). U maloj studiji pokazalo se da sukraloza podiže razinu glukoze i inzulina kod pretilih ženama, kod kojih je povećan rizik od daljnjeg debljanja i razvoja dijabetesa (54).

1. 4. 2 Natrijev ciklamat

Ciklamat je otkriven 1937. na Sveučilištu Illinois, nakon slučajne kontaminacije cigarete derivatom cikloheksilamina. Nedugo nakon, 1950. godine bio je dostupan potrošačima, a potrošnja ciklamata se stalno povećavala sve do otprilike 1969. godine kada je zabranjen u Sjedinjenim Američkim Državama zbog sigurnosnih razloga vezanih za njegovu potencijalnu kancerogenost (55). Ovaj zaslađivač je 30 puta slađi od saharoze, ali ima gorak naknadni okus. Koristi se u kombinaciji sa saharinom, poznatoj pod nazivima Natreen i Süssina. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji prihvatljiv dnevni unos za natrijev ciklamat je 11 mg/kg tjelesne mase. Ciklamat se danas koristi u više od 100 država dok je u SAD-u još uvijek zabranjen za korištenje u prehrambenoj industriji. Nešto novije istraživanje iz 2018. godine provedeno na staničnoj liniji osteoblasta sugerira da vrlo male doze natrijeva ciklamata mogu oštetiti mikrofilamente i mikrotubule osteoblasta, smanjiti njihovu mineralizaciju i potisnuti ekspresiju koštanog morfogenskog proteina-2 (56).

2. Hipoteza

Natrijev ciklamat i sukraloza u određenim koncentracijama aktiviraju inzulinski put i mijenjaju metabolički odgovor diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma na tretman inzulinom i levodopom.

3. Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja su bili ispitati učinke tretmana triju koncentracija natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) samostalno, te u kombinacijama s inzulinom i levodopom na preživljenje, inzulinski signalni put i metabolički odgovor diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma.

4. Materijali i metode

4.1 Ustroj studije

Studija je ustrojena kao studija parova. Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultet u Osijeku.

4.2 Materijali

4.2.1 Stanična linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

U istraživanju je korištena stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y, ATCC CRL-2266 (*Manassas, Virginia, USA*) ispod pasaže 10 (57).

4.3 Metode

4.3.1 Uzgoj i diferencijacija stanica

U istraživanju je korištena stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y. Stanice su uzgojene u DMEM/F12 mediju obogaćenom s 3 mM L-glutamina, 100 mM neesencijalnih aminokiselina, 0,1 mg/mL streptomocina, 100 IU penicilina G, 15 mM HEPES-a, 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1 mM natrijeva piruvata. Stanice su diferencirane pomoću 10 mM *trans*-retinoične kiseline tijekom 9 dana. Za svaki eksperiment stanice su uzgojene i diferencirane minimalno u biološkom triplicatu. Svaka eksperimentalna skupina je imala odgovarajuću kontrolnu skupinu bez tretmana sladilima. Za analizu proteina Western blot tehnikom i metaboloma MALDI-TOF MS tehnikom stanice su uzgojene, diferencirane i tretirane na pločicama sa 6 jažica, a za MTT test na pločicama sa 96 jažica.

4.3.2 Tretmani

Diferencirane stanice su zasebno tretirane trima koncentracijama natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) tijekom 24 sata u DMEM/F12 obogaćenom mediju bez FBS-a i antibiotika. Nakon tretmana sladilima stanice su tretirane inzulinom (2 µg/mL), levodopom (1 µg/mL) i kombinacijom inzulina i levodope u trajanju od 1 sat. Stanice su nakon uzgoja i tretmana umjetnim sladilima te dodatnim tretmanima homogenizirane ultrazvučnim homogenizatorom (*Bandelin Sonopuls 2070, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany*) u Tris puferu s inhibitorima proteaza (Tablica 1).

4. 3. 3 Stanično preživljenje MTT test

Citotoksični učinak triju koncentracija oba sladila određeno je MTT testom prema uputama proizvođača (*Abcam, Cambridge, UK*) (58). MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid) je test redukcije pogodan za primjenu u 96 jažica. Stanice su za MTT test uzgojene na pločicama s 96 jažica. MTT kolorimetrijski test izvodi se dodavanjem otopine MTT soli 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromida u jažice s tretiranim stanicama. Metabolički aktivne stanice sadržavaju enzim dehidrogenazu koji reducira MTT sol u spoj formazan (59). Posljedica prethodne reakcije je ljubičasto obojenje otopine jer se formazan nakuplja u obliku sitnih ljubičastih kristala unutar stanica. Zatim se pomoću mikročitača (*iMark, Bio Rad, Hercules, CA, USA*) očitao intenzitet obojenja otopine pri valnoj duljini od 595 nm. Očitani intenzitet obojenja je proporcionalan broju metabolički aktivnih stanica u svakom uzorku. Rezultati MTT testa su prikazani kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

4. 3. 4 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda po Bradfordu se temelji na reakciji između proteina i *Coomassie Brilliant Blue G-250* boje u kiselom okruženju. U reakciji dolazi do vezanja boje ionskim vezama za argininske skupine proteina. Takve interakcije za posljedicu imaju promjenu smeđe u ljubičastu boju te promjenu apsorbanacije sa 465 nm na 595 nm. Ukupna količina proteina u uzorcima izmjerena je metodom po *Bradfordu* u mikrotitarskim pločicama s ravnim dnom prema uputama proizvođača (*BioRad, Hercules, California, USA*) (60). U jažice su nanoseni triplikati uzoraka u količini od 1 μL i 200 μL Bradford reagensa (*Thermo Scientific Pierce Coomassie Plus Protein Assay, Massachusetts, USA*). Negativna je kontrola nanosena u triplikatu, a sadržavala je samo Bradfordov reagens. Nakon što je mikrotitarska pločica odstojala je na sobnoj temperaturi 10 minuta, očitana je apsorbanacija na *Bio Rad iMark™ Microplate Absorbance Reader* pri 595 nm. Prethodno elektroforezi količina proteina je bila ujednačena za svaki uzorak u triplikatu na 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4. 3. 5 Elektroforeza i Western blot metoda

Analiza proteina i ispitivanje aktivnosti inzulinskog signalnog puta obavljeno je SDS-PAGE elektroforezom i Western blot metodom. Korištena SDS-PAGE elektroforeza je analitička metoda pomoću koje se denaturirani proteini razdvajaju na temelju molekularne mase u poliakrilamidom gelu (61). Denaturacija proteina obavljena je kuhanjem uzoraka na 100 °C tijekom 5 minuta u koje je prethodno dodan β -merkaptoetanol. Kako bi proteini putovali prema

pozitivno nabijenoj elektrodi i razdvajali se na temelju molekularne mase, korišten je detergent natrijev dodecil-sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl-sulfate*) koji je proteinima dao negativan naboj (62). Na svaki gel je najprije nanoseno 5 μ L proteinskog standarda (*SeeBlue 2 Plus, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA*), a potom 15 μ L svakog uzorka. SDS-PAGE elektroforeza je provedena u *Hoeffer* sustavu (*Hoeffer inc. San Francisco, California, United States*) uz jakost električnog polja 15 mA po gelu, u puferu za elektroforezu kroz 3 sata.

Nakon elektroforeze gelovi su aktivirani i proteini su vizualizirani pomoću automatiziranog protokola u trajanju od 45 sekundi *ChemiDoc™ Imaging* sustava (*BioRad Hercules, California, USA*). Potom je uslijedila Western blot metoda pomoću koje su proteini iz gela preneseni na aktiviranu membranu od poliviniliden difluorida (PVDF, engl. *polyvinylidene fluoride*), (*Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA*). Aktivacija PVDF membrane je obavljena pomoću metanola i destilirane vode. Western blot metoda provedena je u *Thermo Fisher mini blot* sustavu uz jakost električnog polja 200 mA, u *Towbin* puferu kroz 2 sata (Tablica 1). Nakon prijenosa proteina, PVDF membrane su snimljene u *ChemiDoc™ Imaging* sustavu (*BioRad Hercules, California, USA*) kako bi se vizualizirali proteini i potvrdila uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu. U 3 %-tnu otopinu BSA dodana su visokospecifična primarna protutijela u omjernu 1:1000 (Tablica 2). Zatim su membrane inkubirane u visokospecifičnim primarnim protutijelima do 24 sata na 4 °C uz kontinuiranu rotaciju. Nakon inkubacije membrane su isprane tri puta u trajanju od 10 minuta u PBS puferu s dodatkom detergenta *Tween-20*. Nakon ispiranja membrane su inkubirane u 3 %-tnoj otopini BSA s odgovarajućim sekundarnim protutijelom na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata uz kontinuiranu rotaciju (Tablica 2). Nakon inkubacije membrane su ponovno isprane prema gore navedenom protokolu. Potom su membrane inkubirane u *Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescence Kit* prema protokolu proizvođača (*BioRad*) te vizualizirane sustavom za vizualizaciju (*ChemiDoc™ Imaging system, BioRad Hercules, California, USA*). Dobiveni rezultati su analizirani i kvantificirani pomoću *Image J* programa (*NIH, Maryland, USA*).

Tablica 1. Sastav otopina korištenih u Western blot metodi

Naziv otopine	Sastav otopine
Tris pufer s inhibitorima proteaza	1x PBS, 0,32 M sukroze, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 1 tableta <i>complete mini protease inhibitor</i> na 10 mL pufera (Roche, Basel Switzerland)
Pufer za elektroforezu	0,35 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % SDS, 30 % glicerol, 9,3 % DTT
Western blot pufer	25 mM Tris-Base (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 192 mM glicin (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 0,1 % SDS u destiliranoj vodi
Towbin pufer	25 mM Tris-Base, 192 mM glicin, 20 % metanola u destiliranoj vodi
1x fosfatni pufer (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (GramMol, Zagreb, Hrvatska)
Otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA)	3 % BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in 1x PBS-T

Tablica 2. Popis primarnih i sekundarnih protutijela korištenih u Western blot metodi

Protutijelo	Puno ime protutijela	Klasa	Porijeklo	Proizvođač i kataloški broj	Razrjeđenje
Akt	<i>Anti-protein kinase B</i>	IgG, monoklonalno	Miš	<i>Cell signaling Danvers, Massachusetts, USA Cat. No. 2920S</i>	1:1000
pAkt	<i>Anti-protein kinase B – phosphorylated on serine 473</i>	IgG, monoklonalno	Zec	<i>Cell signaling Danvers, Massachusetts, USA Cat. No. 9271S</i>	1:1000
GSK3 α/β	<i>Anti-glycogen synthase kinase 3 alpha + beta</i>	IgG, monoklonalno	Zec	<i>Cell signaling Danvers, Massachusetts, USA Cat. No. 5676S</i>	1:1000
pGSK3 α/β	<i>Anti-glycogen synthase kinase 3 - tyrosine 279 phosphorylated GSK3alpha and tyrosine 216 phosphorylated GSK3beta</i>	IgG, monoklonalno	Zec	<i>Thermo Fisher Waltham, Rockford, USA Cat. No. OPA1-03083</i>	1:1000
IGF1Rβ	<i>Anti-Insulin-like growth factor receptor – beta subunit</i>	IgG, poliklonalno	Zec	<i>Santa Cruz, CA, SAD Cat.No. sc-713</i>	1:500
αMO-biotin	<i>Anti-mouse antibody labeled with biotin</i>	IgG	Koza	<i>Jackson immunoresearch West Grove, Pennsylvania, USA Cat. No. 115-065-071</i>	1:20000
αRB-biotin	<i>Anti-rabbit antibody labeled with biotin</i>	IgG	Koza	<i>Jackson immunoresearch West Grove, Pennsylvania, USA Cat.No. 111-065-144</i>	1:20000

4.3.6 MALDI-TOF MS metoda

Ukupni učinak na metabolički odgovor tretiranih diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) izmjeren je MALDI-TOF MS metodom (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Metaboliti su iz uzoraka izolirani pomoću kloroforma, metanola i destilirane vode prema *Blight-Dyerovom* protokolu za dvofaznu izolaciju. Korištena matrice za pozitivan način snimanja je dihidroksibenzojeva kiselina (DHB), a za negativan način snimanja 9-aminoakridin (9-AA). Nakon izolacije uzorci su snimljeni u pozitivnom i negativnom ionizacijskom načinu. Nakon snimanja generirani su m/z spektri (vrijednosti omjerna mase i naboja) s pripadajućim vrijednostima intenziteta. Za daljnju analizu u R statističkom programu pomoću KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) i FELLA paketa su korišteni m/z spektri i njihovi intenziteti. Podatci o učincima sladila na metaboličke spojeve generirani su nakon KEGGREST analize značajnih signala dobivenih MALDI-TOF MS snimanjem. Značajno promijenjeni spojevi su izdvojeni automatskim pretraživanjem KEGG baze podataka koja je dio KEGG paketa. Identificirane spojeve je FELLA paket koristio za analizu međusobne povezanosti spojeva što je kao rezultat dalo listu značajno promijenjenih metaboličkih puteva u eksperimentalnoj grupi.

4.4 Statističke metode

Razine značajnosti za sve statističke testove postavljene su na $\alpha = 0,05$. Dobiveni podatci testirani su na normalnost raspodjele Shapiro-Wilkovim testom. Homogenost varijanci testirana je Bartlettovim F-testom. Uzorci su analizirani po dvije varijable. Prva je koncentracija sladila, a druga je dodatni tretman inzulinom, levodopom ili njihovom kombinacijom. U slučaju normalnosti distribucije i homogene varijance koristila se dvosmjerna ANOVA. U slučaju statistički značajnog rezultata dvosmjerne ANOVA statistička značajnost razlika između grupa ispitala se Tukey HSD post hoc testom. Sve vrijednosti P manje od 0,05 smatraju se statistički značajnima. U slučaju dvosmjerne ANOVA podaci su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Za analizu podataka dobivenih MALDI-TOF MS snimanjem koristio se Studentov t-test. Razlike u intenzitetima signala svakog detektiranog spoja testirale su se zasebno. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$ uz *false discovery rate* (FDR) korekciju P vrijednosti kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati. Za statističke analize koristio se računalni statistički program *Statistica 13* (Dell, USA).

5. Rezultati

5. 1 Stanično preživljenje, MTT test

5. 1. 1 Sukraloza

Stanice tretirane sukralozom u sve tri koncentracije gdje je kao dodatan tretman korištena i levodopa imale su značajno veće preživljenje u odnosu na netretiranu ili inzulinom tretiranu kontrolnu skupinu. Sličan značajan učinak se opaža usporedbom unutar koncentracijske skupine, dok između koncentracija nema razlike. Kombinacije tretmana sukralozom i inzulinom nije imalo značajnog utjecaja na preživljenje stanica, čak štoviše dodatak inzulina u skupinu tretiranu 2 mM sukralozom je značajno umanjilo stanično preživljenje (Tablica 3, Tablica 4).

Tablica 3. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVE, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija preživljenja diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y), izmjerenog MTT testom. Stanice tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	7,49
	Inzulin	99,88	10,78
	Levodopa	126,80	7,20
	I + LD	120,38	7,27
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	99,07	4,89
	Inzulin	103,99	5,90
	Levodopa	144,17	4,43
	I + LD	126,95	9,15
Sukraloza 2 mM	Netretirane	82,93	4,01
	Inzulin	83,59	5,41
	Levodopa	123,38	5,57
	I + LD	123,52	4,15
Sukraloza 20 mM	Netretirane	104,13	11,35
	Inzulin	105,84	12,45
	Levodopa	137,86	8,28
	I + LD	137,36	6,46
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
69,907; (3, 80)		< 0,0001	
32,893; (3, 80)		< 0,0001	
2,492; (9, 80)		0,0064	

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 4. Prikaz značajnih rezultata post hoc Tukey HSD testa dvosmjerne ANOVA rezultata za stanično preživljenje diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y), mjereno MTT testom. Stanice tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	Kontrola	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	Kontrola	I + LD	0,0015
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Netretirane	2 mM	Netretirane	0,0179
Kontrola	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0283
Kontrola	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0002
Kontrola	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	Kontrola	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	Kontrola	I + LD	0,0013
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	2 mM	Netretirane	0,0194
Kontrola	Inzulin	2 mM	Inzulin	0,0306
Kontrola	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Inzulin	2 mM	I + LD	0,0002
Kontrola	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Inzulin	0,0003
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Levodopa	0,0144
Kontrola	Levodopa	2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Levodopa	2 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0003
Kontrola	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0009
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Netretirane	0,0007
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Inzulin	0,0288
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	I + LD	2 mM	Netretirane	0,0001

5. Rezultati

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	I + LD	2 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0315
Kontrola	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0132
Kontrola	I + LD	20 mM	I + LD	0,0190
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Netretirane	0,0339
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0003
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Netretirane	0,0009
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Inzulin	0,0014
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0032
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	I + LD	0,0028
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	0,2 mM	I + LD	0,0161
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	Levodopa	0,0011
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0012
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0003
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0008
Sukraloza 2 mM	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Netretirane	0,0008
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0003
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 2 mM	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0001

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Sukraloza 2 mM	Inzulin	2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0013
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Inzulin	0,0004
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0035
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0128
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0032
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0116
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0001

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

5. 1. 2 Natrijev ciklamat

Natrijev ciklamat je na preživljenje stanica imao o koncentraciji ovisan učinak. Najmanja koncentracija je značajno povećala preživljenje stanica neovisno o dodatnom tretmanu inzulinom ili levodopom. Važno za spomenuti je kombinirani učinak najmanje doze natrijeva ciklamata, inzulina i levodope koji su pokazali sinergistički učinak na preživljenje stanica u usporedbi sa svim kontrolnim skupinama. Sličan pozitivan učinak je opažen kod stanica koje su tretirane s 10 mM natrijeva ciklamata te levodopom. Povećanjem koncentracije natrijeva ciklamata pozitivan učinak na preživljenje stanica izostaje i tretiranje levodopom ili kombinacijom levodope i inzulina ne vraća stopu preživljenja na vrijednosti opažene s najmanjom koncentracijom. Tretman samo inzulinom nije imao značajan učinak na preživljenje stanica uz iznimku kada su stanice istovremeno tretirane s 1 mM natrijeva ciklamata i inzulinom. Pri većim koncentracijama sladila taj efekt inzulina u potpunosti izostaje, osim toga čak je smanjeno preživljenje stanica (Tablica 5, Tablica 6).

Tablica 5. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVE, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija preživljenja diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y), izmjerenog MTT testom. Stanice tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	7,49
	Inzulin	99,88	10,78
	Levodopa	126,80	7,20
	I + LD	120,38	7,27
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	133,20	10,51
	Inzulin	145,09	14,64
	Levodopa	165,85	29,85
	I + LD	173,63	29,44
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	112,39	21,08
	Inzulin	98,33	6,89
	Levodopa	156,95	15,57
	I + LD	150,78	10,28
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	80,97	10,75
	Inzulin	89,79	6,41
	Levodopa	98,62	6,13
	I + LD	109,31	14,00
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		*P vrijednost	
69,907; (3, 80)		< 0,0001	
32,893; (3, 80)		< 0,0001	
2,492; (9, 80)		0,0145	

I + LD = inzulin i levodopa; *P < 0,05

Tablica 6. Prikaz značajnih rezultata post hoc Tukey HSD testa dvosmjerne ANOVA rezultata za stanično preživljenje diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y), mjereno MTT testom. Stanice tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope.

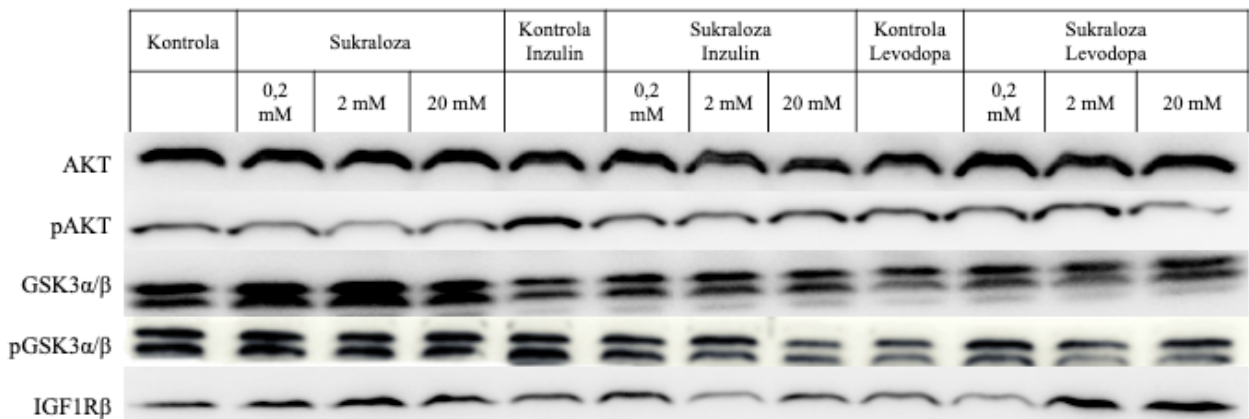
Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	1 mM	Netretirane	0,0206
Kontrola	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0003
Kontrola	Netretirane	1 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Netretirane	10 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0002
Kontrola	Inzulin	1 mM	Netretirane	0,0197
Kontrola	Inzulin	1 mM	Inzulin	0,0003
Kontrola	Inzulin	1 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Netretirane	10 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0002
Kontrola	Levodopa	1 mM	Levodopa	0,0022
Kontrola	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0002
Kontrola	Levodopa	100 mM	Netretirane	0,0002
Kontrola	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0050
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Levodopa	0,0250
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	I + LD	0,0013
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0112
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Netretirane	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0005
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0125
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	Levodopa	0,0003
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0029
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	Netretirane	0,0381
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Levodopa	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0002

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	I + LD	0,0009

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

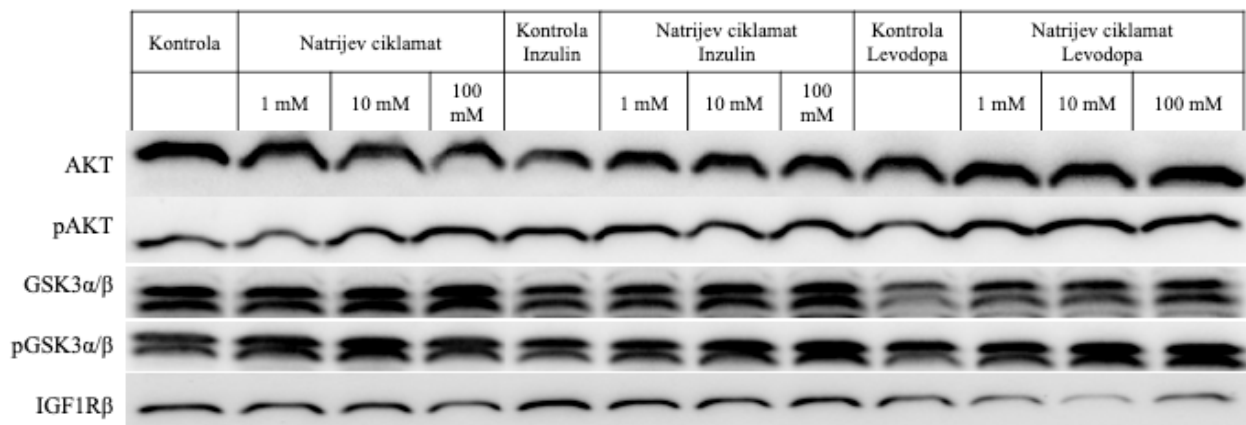
5. 2 Western blot analiza proteina

Tretmani diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) te dodatnih tretmana uzrokovali su promjene u razinama proteina AKT, pAKT, GSK3 α , GSK3 β , pGSK3 α , pGSK3 β i IGF1R β (Slika 1, Slika 2, Slika 3). Rezultati dobiveni Western blot metodom su analizirani i kvantificirani pomoću *Image J* programa.



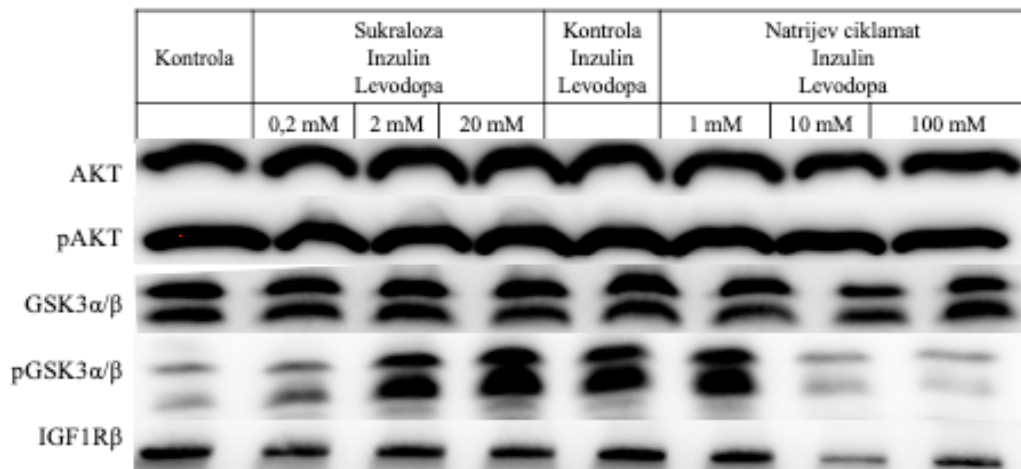
Slika 1. Prikaz rezultata Western blot metode za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma tretirane s tri koncentracije sukraloze i dodatnim tretmanima inzulinom i levodopom.

Izvor: fotografirala autorica rada.



Slika 2. Prikaz rezultata Western blot metode za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma tretirane s tri koncentracije natrijeva ciklamata i dodatnim tretmanima inzulinom i levodopom.

Izvor: fotografirala autorica rada.



Slika 3. Prikaz rezultata Western blot metode za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma tretirane s tri koncentracije sukraloze i natrijeva ciklamata te dodatnim tretmanom kombinacije inzulina i levodope. Izvor: fotografirala autorica rada.

5. 2. 1 Sukraloza

Razine AKT proteina značajno su snižene u odnosu na kontrolnu skupinu dodatkom inzulina s izuzetkom skupine tretirane s 0,2 mM sukraloze. Međutim, tretman sukralozom kombiniran s dodatnim tretmanom levodopom uzrokovao je porasta razine AKT proteina. Ovaj učinak nije opažen u kontrolnoj skupini. Kombiniranje dodatnog tretmana inzulinom i levodopom značajno je promijenilo razine AKT proteina samo u skupini tretiranoj 0,2 mM sukraloze u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7, Tablica 8).

Aktivni oblik AKT proteina fosforiliranog na serinu 473 (pAkt) u kontrolnoj skupini je pratio očekivani trend gdje je došlo do značajnog porasta razine proteina nakon tretiranja s inzulinom. Ovaj je učinak izostao kod skupina koje su tretirane sukralozom neovisno o koncentraciji sladila. Kombinacija inzulina i levodope značajno povećava fosforilaciju u svim skupinama u odnosu na netretiranu kontrolu, a posebice je ovo vidljivo pri najmanjoj koncentraciji sukraloze gdje je došlo do peterostrukog povećanja razine proteinskog signala. Kod stanica koje su tretirane samo levodopom došlo je do porasta razine fosforiliranog AKT proteina u usporedbi s kontrolnom (Tablica 9, Tablica 10).

Značajno je smanjena razine GSK3 α proteina nakon tretmana s inzulinom uspoređeno s netretiranom kontrolnom skupinom. Izuzetak potonjem su stanice tretirane s 2 mM sukraloze. Također, značajan pad razina proteina je vidljiv na stanicama tretiranim srednjom i najvećom

koncentracijom sukraloze uz dodatni tretman inzulinom i levodopom. Pri nižoj koncentraciji sukraloze i u kontrolnoj skupini ovaj učinak izostaje (Tablica 11, Tablica 12).

Tretman samo sukralozom neovisno o koncentraciji uspoređeno s kontrolnom skupinom uzrokovao je porast razine GSK3 β proteina. Dodatni tretman inzulinom je spustio povišene razine proteina na razinu sličnu onoj koja je opažena u kontrolnoj skupini, uz izuzetak skupine tretirane s 2 mM sukraloze. Tretman stanica kombinacijom inzulina i levodope doveo je do smanjenja razine proteina GSK3 β u usporedbi s kontrolnom netretiranom skupinom (Tablica 13, Tablica 14).

Fosforilirani oblik GSK3 α odnosno pGSK3 α nije značajno promijenjen tretmanima, ali je uočen značajan pad razine proteina pri najvećoj koncentraciji sukraloze u kombinaciji s inzulinom (Tablica 15, Tablica 16).

Neovisno o koncentracijskoj skupini, tretman sukralozom uzrokovao je sniženu razinu fosforiliranog oblik GSK3 β odnosno pGSK3 β . Najznačajnije promjene uzrokovali su dodatni tretmani inzulinom, levodopom ili njihova kombinacija. Inzulin i levodopa su ostvarili značajno smanjenje razine proteina neovisno o tretmanu sukralozom na razine od 50 % do 70 % netretirane kontrole. Kombinacija inzulina i levodope je imala značajan učinak samo pri koncentraciji 20 mM sukraloze, gdje je opažen povratak razine pGSK3 β na vrijednosti kontrolne netretirane skupine (Tablica 17, Tablica 18).

Tretmani sukralozom su uzrokovali pad razine membranski vezanog proteina IGF1R β . Značajna standardna devijacije između mjerenja je rezultirala samo nekolicinom statistički značajnih rezultata. U sve tri koncentracije sukraloze, tretman inzulinom je značajno smanjio razine IGF1R β u odnosu na netretiranu kontrolu. Isti učinak je vidljivi kod kombinacije inzulina i levodope, ali pri koncentracijama 0,2 mM i 2 mM sukraloze. Kombinacija najveće koncentracije sukraloze i levodope nije ostvarila statistički značajne promjene (Tablica 19, Tablica 20).

Tablica 7. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, AKT proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	8,98
	Inzulin	80,38	4,94
	Levodopa	90,73	10,30
	I + LD	86,36	6,84
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	116,19	7,35
	Inzulin	66,07	7,97
	Levodopa	120,54	9,58
	I + LD	113,49	3,39
Sukraloza 2 mM	Netretirane	88,98	6,77
	Inzulin	93,94	4,85
	Levodopa	120,71	1,60
	I + LD	86,39	13,62
Sukraloza 20 mM	Netretirane	99,04	2,77
	Inzulin	63,79	7,42
	Levodopa	138,71	10,64
	I + LD	96,08	21,89
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
10,390; (3, 80)		< 0,0001	
81,280; (3, 80)		< 0,0001	
16,820; (9, 80)		< 0,0001	

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 8. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, AKT proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	Kontrola	Inzulin	0,0370
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0222
Kontrola	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0201
Kontrola	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Netretirane	0,0011
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Inzulin	0,0018
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	I + LD	0,0059
Kontrola	Levodopa	2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0005
Kontrola	Levodopa	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Netretirane	0,0002
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Inzulin	0,0255
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	I + LD	0,2 mM	I + LD	0,0004
Kontrola	I + LD	2 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0067
Kontrola	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Netretirane	0,0004
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0081
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0069
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0282
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Netretirane	0,0054

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Inzulin	0,0003
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	I + LD	0,0251
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	Netretirane	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	Inzulin	0,0006
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0127
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0020
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Netretirane	0,0020
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Inzulin	0,0384
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	I + LD	0,0004
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0013
Sukraloza 2 mM	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0013
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 2 mM	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0005
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Inzulin	0,0002
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 2 mM	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0115
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0018
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0065
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 20 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0001

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 9. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, pAkt proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	25,74
	Inzulin	148,34	33,36
	Levodopa	86,58	15,47
	I + LD	177,33	14,21
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	191,36	25,15
	Inzulin	74,34	14,88
	Levodopa	116,91	39,29
	I + LD	597,16	117,44
Sukraloza 2 mM	Netretirane	149,63	36,82
	Inzulin	86,87	14,95
	Levodopa	117,99	52,94
	I + LD	213,66	149,74
Sukraloza 20 mM	Netretirane	132,50	52,01
	Inzulin	69,76	8,29
	Levodopa	98,73	41,90
	I + LD	227,50	22,82
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
33,940; (3, 80)		< 0,0001	
71,724; (3, 80)		< 0,0001	
19,326; (9, 80)		< 0,0001	

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 10. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pAkt proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Netretirane	0,0172
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0469
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Netretirane	0,0026
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0484
Kontrola	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0152
Kontrola	I + LD	0,2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0005
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0027
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0003
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0145
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	I + LD	0,0175
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0050
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	0,2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 2 mM	Inzulin	2 mM	I + LD	0,0495
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0156
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0117
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0032
Sukraloza 20 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0423

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 11. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, GSK3 α protein za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	27,93
	Inzulin	68,96	15,80
	Levodopa	78,30	10,85
	I + LD	99,13	8,90
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	121,79	27,06
	Inzulin	61,97	9,48
	Levodopa	102,42	10,53
	I + LD	111,56	5,96
Sukraloza 2 mM	Netretirane	98,97	20,10
	Inzulin	89,78	16,01
	Levodopa	102,96	13,92
	I + LD	58,23	7,22
Sukraloza 20 mM	Netretirane	97,66	7,08
	Inzulin	56,58	6,41
	Levodopa	122,61	14,66
	I + LD	72,04	12,10
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
3,100; (3, 60)		0,0333	
22,787; (3, 60)		< 0,0001	
7,378; (9, 60)		< 0,0001	

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 12. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, GSK3 α proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0173
Kontrola	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0212
Kontrola	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0030
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Netretirane	0,0002
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0169
Kontrola	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Levodopa	2 mM	Netretirane	0,0029
Kontrola	Levodopa	20 mM	Levodopa	0,0022
Kontrola	I + LD	2 mM	I + LD	0,0268
Kontrola	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0171
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0021
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0080
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	I + LD	0,0022
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Netretirane	0,0237
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0067
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0349
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0108
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0013
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	I + LD	0,0008
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0005
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	I + LD	0,0385
Sukraloza 2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0280
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0042
Sukraloza 2 mM	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0093
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0011
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0394
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0065
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0016

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 13. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, GSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	22,03
	Inzulin	81,95	5,79
	Levodopa	80,21	13,18
	I + LD	96,36	10,31
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	170,52	20,33
	Inzulin	80,99	17,30
	Levodopa	134,49	16,22
	I + LD	107,36	4,44
Sukraloza 2 mM	Netretirane	153,73	34,99
	Inzulin	112,62	9,38
	Levodopa	124,05	19,93
	I + LD	84,31	11,36
Sukraloza 20 mM	Netretirane	159,06	9,15
	Inzulin	80,47	5,84
	Levodopa	157,75	17,02
	I + LD	113,00	19,65
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
25,217; (3, 84)		< 0,0001	
61,783; (3, 84)		< 0,0001	
9,581; (9, 84)		< 0,0001	

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 14. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, GSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0174
Kontrola	Netretirane	2 mM	Netretirane	0,0002
Kontrola	Netretirane	20 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Inzulin	2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0010
Kontrola	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Levodopa	2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Levodopa	2 mM	Inzulin	0,0355
Kontrola	Levodopa	2 mM	Levodopa	0,0005
Kontrola	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Levodopa	20 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	I + LD	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	I + LD	2 mM	Netretirane	0,0006
Kontrola	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0002
Kontrola	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0003
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0100
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0003
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0006
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	0,2 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Inzulin	0,0458

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	2 mM	Levodopa	0,0007
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	2 mM	I + LD	0,0049
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	2 mM	Netretirane	0,0142
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0031
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0046
Sukraloza 2 mM	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0014
Sukraloza 2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0003
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Inzulin	0,0386
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0004
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0144
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0006
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Levodopa	0,0229
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0001
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	I + LD	0,0155
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 20 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0220

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 15. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, pGSK3 α proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	27,18
	Inzulin	78,85	16,37
	Levodopa	63,54	14,39
	I + LD	90,92	15,53
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	107,59	31,52
	Inzulin	69,93	11,24
	Levodopa	94,96	16,40
	I + LD	94,35	22,20
Sukraloza 2 mM	Netretirane	79,23	13,06
	Inzulin	90,18	16,65
	Levodopa	83,48	16,65
	I + LD	59,34	5,16
Sukraloza 20 mM	Netretirane	98,77	10,47
	Inzulin	45,68	6,08
	Levodopa	107,70	32,81
	I + LD	91,87	17,01
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
1,216; (3, 68)		0,3106	
8,618; (3, 68)		< 0,0001	
5,337; (9, 68)		< 0,0001	

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 16. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pGSK3 α proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0007
Kontrola	Levodopa	2 mM	Netretirane	0,0141
Kontrola	Levodopa	20 mM	Levodopa	0,0137
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0067
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0065
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0031
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Inzulin	0,0124
Sukraloza 20 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0010
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0002

I + LD = inzulin i levodopa; **P* < 0,05

Tablica 17. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pGSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	17,90
	Inzulin	77,61	7,76
	Levodopa	57,46	9,68
	I + LD	86,66	8,04
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	110,21	19,62
	Inzulin	55,86	9,34
	Levodopa	75,71	8,37
	I + LD	51,66	22,45
Sukraloza 2 mM	Netretirane	79,01	9,71
	Inzulin	66,52	9,96
	Levodopa	65,28	14,33
	I + LD	53,97	1,28
Sukraloza 20 mM	Netretirane	91,19	6,73
	Inzulin	44,68	6,80
	Levodopa	71,24	10,98
	I + LD	106,40	15,36
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
5,378; (3, 68)		0,0022	
36,397; (3, 68)		< 0,0001	
9,829; (9, 68)		< 0,0001	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 18. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pGSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu, Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Sukraloza koncentracija	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	Kontrola	Levodopa	0,0001
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0007
Kontrola	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0009
Kontrola	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0005
Kontrola	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0014
Kontrola	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0083
Kontrola	Inzulin	0,2 mM	Netretirane	0,0013
Kontrola	Inzulin	20 mM	Inzulin	0,0012
Kontrola	Levodopa	0,2 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0008
Kontrola	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0006
Kontrola	I + LD	0,2 mM	I + LD	0,0470
Kontrola	I + LD	20 mM	Inzulin	0,0054
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0006
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	0,2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Netretirane	0,0026
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	Levodopa	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	20 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0004
Sukraloza 0,2 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0004
Sukraloza 0,2 mM	Levodopa	20 mM	Inzulin	0,0028
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	I + LD	0,0120
Sukraloza 0,2 mM	I + LD	20 mM	I + LD	0,0002
Sukraloza 2 mM	Netretirane	20 mM	Netretirane	0,0006
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Netretirane	0,0486
Sukraloza 2 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0107
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Netretirane	0,0292
Sukraloza 2 mM	Levodopa	20 mM	Levodopa	0,0071
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Netretirane	0,0246

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Sukraloza koncentracija	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Sukraloza 2 mM	I + LD	20 mM	Levodopa	0,0002
Sukraloza 20 mM	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0001
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	Levodopa	0,0222
Sukraloza 20 mM	Inzulin	20 mM	I + LD	0,0001
Sukraloza 20 mM	Levodopa	20 mM	I + LD	0,0449

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 19. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, IGF1R β protein za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	29,65
	Inzulin	52,53	24,86
	Levodopa	65,15	21,10
	I + LD	76,64	14,34
Sukraloza 0,2 mM	Netretirane	80,60	29,91
	Inzulin	48,99	13,81
	Levodopa	44,55	30,61
	I + LD	68,83	12,18
Sukraloza 2 mM	Netretirane	75,19	25,21
	Inzulin	33,38	13,10
	Levodopa	70,55	32,24
	I + LD	35,02	15,25
Sukraloza 20 mM	Netretirane	80,39	30,48
	Inzulin	46,49	30,89
	Levodopa	86,41	45,47
	I + LD	47,38	18,67
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
2,495; (3, 80)		0,0658	
9,504; (3, 80)		< 0,0001	
1,695; (9, 80)		0,1038	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 20. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, IGF1R β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina sukraloze	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	0,2 mM	Levodopa	0,0321
Kontrola	Netretirane	2 mM	Inzulin	0,0029
Kontrola	Netretirane	2 mM	I + LD	0,0042
Kontrola	Netretirane	20 mM	Inzulin	0,0467

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

5. 2. 2 Natrijev ciklamat

Inzulin i levodopa samostalno i u kombinaciji uzrokovali su značaj pad razine AKT proteina u usporedbi s netretiranom kontrolom. Također, pad razina AKT proteina je opažen kod tretmana natrijevim ciklamatom u koncentracijama 10 mM i 100 mM. Ovaj učinak izostaje pri najnižoj koncentraciji natrijeva ciklamata. Natrijev ciklamat i kombinacija dodatnog tretmana inzulina i levodope ostvarili su značajan porast u razinama AKT proteina u odnosu na kontrolne skupine (Tablica 21, Tablica 22).

pAkt u kontrolnoj skupini je značajno porastao nakon dodatnog tretmana s inzulinom, isti trend se vidi u kombinacijama inzulina i natrijeva ciklamata. Kod tretmana levodopom i natrijevim ciklamatom razine su se također povećale u usporedbi s netretiranom kontrolom. Kombinacije dodatnih tretmana inzulina i levodope su povećale razine pAkt proteina gotovo višestruko, a najveći porast je uočen pri najvećoj koncentraciji natrijeva ciklamata (Tablica 23, Tablica 24).

Tretman natrijevim ciklamatom nije imao značajan učinak na razine GSK3 α niti u jednoj koncentracijskoj skupini (Tablica 25).

Natrijev ciklamat je značajno povećao razine GSK3 β proteina neovisno o koncentraciji, a najveći porast je uočen u tretmanu s 1 mM natrijeva ciklamata. Levodopa ima značajan učinak na porast razine GSK3 β u stanicama tretiranim ciklamatom u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali ne u usporedbi s tretmanima natrijevim ciklamatom. Inzulin s druge strane spušta razine GSK3 β na razine slične onima u kontrolnim skupinama u usporedbi s tretmanima natrijevim ciklamatom (Tablica 26, Tablica 27).

Tretman natrijevim ciklamatom ima vidljiv učinak na pGSK3 α . Samo tretman natrijevim ciklamatom značajno je povećao fosforilaciju GSK3 α za približno 30 % u odnosu na kontrolnu skupinu. Inzulin značajno smanjuje fosforilaciju, a kombinacija ciklamata i inzulina nema dodatan učinak na to smanjenje. Levodopa ima sličan učinak kao i inzulin na razine fosforilacije GSK3 α odnosno smanjuje ga bez dodatnog učinka nakon tretmana s natrijevim ciklamatom. Kombinacije natrijeva ciklamata te inzulina i levodope ostvarile su značajno povećanje fosforilacije u usporedbi s kontrolom skupinom (Tablica 28, Tablica 29).

Na fosforilaciju GSK3 β tretman natrijevim ciklamatom nije imao značajan učinak. Inzulin i levodopa su značajno smanjili razine pGSK3 β , a pri srednjoj i najvećoj koncentraciji natrijeva ciklamata slično kao i u kontrolnoj skupini (Tablica 30, Tablica 31).

Na IGF1R β protein, tretman natrijevim ciklamatom ili dodatni tretmani zasebno, nisu imali statistički značajne promjene. Učinak je jedino značajan kod dodatnog tretmana levodopom koji ako se primjeni u kombinaciji s natrijevim ciklamatom neovisno o koncentraciji dovodi do smanjenja razine IGF1R β (Tablica 32, Tablica 33).

Tablica 21. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, AKT proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	5,86
	Inzulin	63,23	7,69
	Levodopa	92,74	4,60
	I + LD	86,36	6,84
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	98,18	8,46
	Inzulin	65,89	7,24
	Levodopa	87,05	6,46
	I + LD	111,56	6,60
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	84,76	2,67
	Inzulin	67,15	2,65
	Levodopa	93,99	6,13
	I + LD	113,75	1,95
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	78,25	8,30
	Inzulin	68,26	2,91
	Levodopa	91,91	3,39
	I + LD	110,15	12,03
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		P* vrijednost	
2,240; (3, 56)		0,0933	
112,990; (3, 56)		< 0,0001	
9,710; (9, 56)		< 0,0001	

I + LD = Inzulin + Levodopa; * $P < 0,05$

Tablica 22. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, AKT proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	Kontrola	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Netretirane	100 mM	Netretirane	0,0021
Kontrola	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0001
Kontrola	Inzulin	Kontrola	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	Kontrola	I + LD	0,0009
Kontrola	Inzulin	1 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Inzulin	1 mM	Levodopa	0,0006
Kontrola	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	10 mM	Netretirane	0,0025
Kontrola	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0001
Kontrola	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	100 mM	Levodopa	0,0002
Kontrola	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	1 mM	Inzulin	0,0002
Kontrola	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0148
Kontrola	Levodopa	10 mM	Inzulin	0,0003
Kontrola	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0035
Kontrola	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0004
Kontrola	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0351
Kontrola	I + LD	1 mM	Inzulin	0,0050
Kontrola	I + LD	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	I + LD	10 mM	Inzulin	0,0115
Kontrola	I + LD	10 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0232
Kontrola	I + LD	100 mM	I + LD	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Netretirane	0,0072
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	1 mM	Levodopa	0,0032
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	Netretirane	0,0144
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0002

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	100 mM	Levodopa	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0004
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	10 mM	Inzulin	0,0074
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0151
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0009
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Netretirane	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Levodopa	0,0319
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0087
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0312
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0003
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	100 mM	Levodopa	0,0003
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0081
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0020
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 100 mM	Inzulin	100 mM	Levodopa	0,0006
Na-ciklamat 100 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 100 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0213

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 23. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, pAkt proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	30,00
	Inzulin	122,37	14,67
	Levodopa	100,97	18,66
	I + LD	177,33	14,21
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	116,69	30,78
	Inzulin	121,44	5,80
	Levodopa	153,31	32,65
	I + LD	433,37	162,23
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	128,61	15,63
	Inzulin	114,11	15,95
	Levodopa	169,73	28,42
	I + LD	385,02	190,74
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	148,99	5,85
	Inzulin	127,94	12,30
	Levodopa	152,01	30,05
	I + LD	627,10	17,12
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
27,156; (3, 68)		< 0,0001	
115,007; (3, 68)		< 0,0001	
11,446; (9, 68)		< 0,0001	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 24. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pAkt proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	I + LD	1 mM	I + LD	0,0001
Kontrola	I + LD	10 mM	I + LD	0,0003
Kontrola	I + LD	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Levodopa	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	I + LD	0,0006
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Netretirane	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0001

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 100 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0001
Na-ciklamat 100 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0001

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 25. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, GSK3 α proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	14,3
	Inzulin	102,44	8,37
	Levodopa	113,44	7,28
	I + LD	99,13	8,90
Na-Ciklamat 1 μ M	Netretirane	129,42	3,39
	Inzulin	93,96	21,89
	Levodopa	113,30	24,65
	I + LD	115,35	9,10
Na-Ciklamat 10 μ M	Netretirane	107,43	4,67
	Inzulin	109,72	9,87
	Levodopa	115,80	18,06
	I + LD	108,13	10,09
Na-Ciklamat 100 μ M	Netretirane	116,12	8,21
	Inzulin	109,74	3,10
	Levodopa	93,11	32,91
	I + LD	117,26	15,28
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
0,230; (3, 36)		0.8752	
1,183; (3, 36)		0.3297	
2,668; (9, 36)		0.0175	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 26. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, GSK3b proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	17,12
	Inzulin	108,31	12,65
	Levodopa	103,67	8,26
	I + LD	96,36	10,31
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	173,59	1,98
	Inzulin	112,99	24,87
	Levodopa	149,66	40,58
	I + LD	119,60	7,77
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	140,91	32,91
	Inzulin	113,17	17,57
	Levodopa	176,29	21,15
	I + LD	113,76	7,67
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	133,07	18,83
	Inzulin	99,27	32,91
	Levodopa	143,47	8,90
	I + LD	98,18	19,74
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		P* vrijednost	
9,498; (3, 36)		< 0,0001	
11,728; (3, 36)		< 0,0001	
2,107; (9, 36)		0,0548	

I + LD = Inzulin + Levodopa; * $P < 0,05$

Tablica 27. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, GSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu, Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	1 mM	Netretirane	0,0053
Kontrola	Netretirane	1 mM	Levodopa	0,0033
Kontrola	Inzulin	1 mM	Netretirane	0,0209
Kontrola	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0135
Kontrola	Levodopa	1 mM	Netretirane	0,0098
Kontrola	Levodopa	10 mM	Levodopa	0,0062
Kontrola	I + LD	1 mM	Netretirane	0,0028
Kontrola	I + LD	10 mM	Levodopa	0,0018
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0434
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0446
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	I + LD	0,0487
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0047
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0039
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0286
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	Levodopa	0,0294
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0323
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0029
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0024

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 28. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, pGSK3 α proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	15,57
	Inzulin	67,28	22,05
	Levodopa	72,84	9,08
	I + LD	90,92	15,53
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	128,55	27,42
	Inzulin	52,60	23,83
	Levodopa	76,21	19,65
	I + LD	150,29	14,57
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	126,41	43,05
	Inzulin	68,26	23,23
	Levodopa	87,07	9,33
	I + LD	150,94	31,62
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	136,11	31,07
	Inzulin	72,55	17,55
	Levodopa	63,80	20,01
	I + LD	158,59	2,07
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
5,133; (3, 68)		0,0029	
44,585; (3, 68)		< 0,0001	
2,272; (9, 68)		0,0273	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 29. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pGSK3 α proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Inzulin	1 mM	Netretirane	0,0020
Kontrola	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0038
Kontrola	Inzulin	10 mM	Netretirane	0,0034
Kontrola	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0034
Kontrola	Inzulin	100 mM	Netretirane	0,0004
Kontrola	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0009
Kontrola	Levodopa	1 mM	Netretirane	0,0078
Kontrola	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0098
Kontrola	Levodopa	10 mM	Netretirane	0,0130
Kontrola	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0088
Kontrola	Levodopa	100 mM	Netretirane	0,0012
Kontrola	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0023
Kontrola	I + LD	100 mM	I + LD	0,0459
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Levodopa	0,0172
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0025
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0073
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0009
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0004
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	Netretirane	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0003
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	100 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	1 mM	I + LD	0,0171
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	10 mM	Netretirane	0,0278
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	10 mM	I + LD	0,0154
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	100 mM	Netretirane	0,0028
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0042
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	10 mM	Inzulin	0,0045
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0093
Na-ciklamat 1 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0021

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0043
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0121
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0014
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	10 mM	I + LD	0,0040
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	100 mM	Netretirane	0,0004
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0011
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Netretirane	0,0357
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0256
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Inzulin	0,0084
Na-ciklamat 10 mM	I + LD	100 mM	Levodopa	0,0018
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0011
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0002
Na-ciklamat 100 mM	Inzulin	100 mM	I + LD	0,0022
Na-ciklamat 100 mM	Levodopa	100 mM	I + LD	0,0005

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 30. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, pGSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	13,35
	Inzulin	69,46	18,49
	Levodopa	72,31	10,99
	I + LD	86,66	8,04
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	130,50	25,47
	Inzulin	51,60	21,22
	Levodopa	84,22	17,31
	I + LD	103,13	24,42
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	116,11	31,44
	Inzulin	66,40	10,71
	Levodopa	82,79	13,65
	I + LD	82,90	15,27
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	106,85	15,27
	Inzulin	75,93	13,03
	Levodopa	65,25	11,59
	I + LD	73,23	11,55
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
1,845; (3, 68)		0,1473	
32,820; (3, 68)		< 0,0001	
2,360; (9, 68)		0,0216	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 31. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, pGSK3 β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0010
Kontrola	Inzulin	1 mM	Netretirane	0,0001
Kontrola	Inzulin	10 mM	Netretirane	0,0018
Kontrola	Inzulin	100 mM	Netretirane	0,0327
Kontrola	Levodopa	1 mM	Netretirane	0,0002
Kontrola	Levodopa	10 mM	Netretirane	0,0046
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	1 mM	Levodopa	0,0020
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	10 mM	Levodopa	0,0013
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0002
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	100 mM	I + LD	0,0130
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	1 mM	I + LD	0,0427
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	10 mM	Netretirane	0,0001
Na-ciklamat 1 mM	Inzulin	100 mM	Netretirane	0,0002
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	10 mM	Inzulin	0,0007
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	Inzulin	0,0143
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0005
Na-ciklamat 10 mM	Inzulin	100 mM	Netretirane	0,0132
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	100 mM	Levodopa	0,0092

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 32. Prikaz rezultata dvosmjerne ANOVA, srednjih vrijednosti i standardnih devijacija za intenzitet proteinskog signala iz Western blota, IGF1R β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Vrijednosti su izražene kao postotak u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu.

Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Srednja vrijednost (%)	Standardna devijacija (%)
Kontrola	Netretirane	100,00	34,32
	Inzulin	86,26	24,11
	Levodopa	130,38	38,07
	I + LD	76,64	14,34
Na-ciklamat 1 mM	Netretirane	115,02	23,91
	Inzulin	58,82	23,45
	Levodopa	74,66	14,41
	I + LD	95,03	12,05
Na-ciklamat 10 mM	Netretirane	101,12	24,45
	Inzulin	61,74	32,27
	Levodopa	60,08	29,28
	I + LD	84,52	24,74
Na-ciklamat 100 mM	Netretirane	74,58	14,54
	Inzulin	119,20	31,00
	Levodopa	67,07	41,32
	I + LD	96,69	17,04
Dvosmjerna ANOVA			
F vrijednosti; (Stupnjevi slobode)		<i>P</i> * vrijednost	
2,435; (3, 68)		0,0723	
1,572; (3, 68)		0,2024	
4,724; (9, 68)		< 0,0001	

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

Tablica 33. Post hoc Tukey HSD test dvosmjerne ANOVA rezultata za Western blot, IGF1R β proteina za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s tri koncentracije natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su prikazani kao postotak izračunat u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost testirana je pomoću dvosmjerne ANOVA.

Prvi set varijabli (A)		Drugi set varijabli (B)		Post hoc Tukey HSD <i>P</i> * vrijednost A naspram B
Koncentracijska skupina	Dodatni tretman	Koncentracijska skupina Na-ciklamata	Dodatni tretman	
Kontrola	Levodopa	1 mM	Inzulin	0,0044
Kontrola	Levodopa	10 mM	Inzulin	0,0078
Kontrola	Levodopa	10 mM	Levodopa	0,0057
Kontrola	Levodopa	100 mM	Levodopa	0,0215
Na-ciklamat 1 mM	Levodopa	100 mM	Inzulin	0,0361
Na-ciklamat 10 mM	Levodopa	100 mM	Levodopa	0,0448

I + LD = Inzulin + Levodopa; **P* < 0,05

5.3 MALDI-TOF MS analiza

Analizu podataka dobivenih MALDI-TOF MS snimanjem izvršila se Studentovim t-test ($P < 0,05$).

5.3.1 Sukraloza

Tretman stanica samo sukralozom znatno smanjuje količinu metaboličkog prekursora C04823 za *de novo* biosintezu purina. Tretman sukraloze i kombinacije inzulina i levodope također smanjuje količinu prekursora C04640 bitnog za biosintezu purina, ali također i metabolita C03997 koji je dio metabolizma pirimidina. Tretman samo sukralozom povećava razinu metabolita C05595 prisutnog u metabolizmu tirozina, dok tretman u kombinaciji s dodatnim tretmanima znatno smanjuje razine spojeva koji su dijelom metabolizma lizina, fenilalanina i triptofana. Dodatni tretmani levodopom i kombinacijom levodope i inzulina pokazali su značajan učinak na metabolizam masnih kiselina (Tablica 34).

5.3.2 Natrijev ciklamat

Tretman stanica samo natrijevim ciklamatom rezultirao je nakupljanjem spoja C04640 bitnog u *de novo* biosintezi purina, a dodatni tretman kombinacijom inzulina i levodope imao suprotan učinak za C00559. Tretman sladila u kombinaciji s dodatnim tretmanima inzulina i levodope znatno smanjuje razine spojeva koji su dijelom metabolizma lizina i fenilalanina. Dodatni tretman samo inzulinom nije imao značajne učinke stoga nije naveden (Tablica 35).

Tablica 34. Prikaz metaboličkih spojeva za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s 0,2 mM sukraloze i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su generirani nakon KEGGREST značajnih signala dobivenih MALDI-TOF MS pozitivnim i negativnim načinom snimanja.

OBILJEŽJA METABOLITA				USPOREĐENE SKUPINE							
				K_S02K*		KI_S02I†		KLD_S02LD‡		KLD_S02ILD§	
Naziv spoja	KEGG ID	m/z	Adukt	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>
Miristinska kiselina	C06424	246.2	M+NH4					0.0215	6.7091	0.0454	-4.1319
Palmitinska kiselina	C00249	237.2	M-H2O-H							0.0332	3.2319
Koenzim A	C00010	785.1	M+NH4							0.0434	-4.6434
Eruična kiselina	C08316	361.3	M+Na	0.0335	5.3250	0.0387	3.2000				
11-Arahidinska kiselina	C16526	369.3	HAc-H			0.0038	6.1060	0.0167	4.3812		
Arahidinska kiselina	C06425	311.3	M-H	0.0340	-4.5441			0.0008	-11.1926		
GDP-4-dehidro-6-deoksi-D-manoza	C01222	605.1	M+NH4							0.0369	-5.0600
4-Hidroksifenilacetilglutamat	C05595	316.1	M+Cl	0.0374	5.0233						
2-Hidroksi-6-oksonon-2,4-dien-1,9-dioat	C04479	273.1	HAc-H							0.0211	-6.7674
5-Hidroksi-indol-acetil-glicine	C05832	283	M+Cl			0.0406	-4.8094				
6-Acetamid-2-dioksoheksanoat	C05548	246.1	HAc-H					0.0078	-11.2602		
5-Hidroksimetildeoksicitidilna kiselina	C03997	360.1	M+Na					0.0114	-9.3010		
2-(Formamid)-N1-(5'-fosforibozil)acetamidin	C04640	331.1	M+NH4					0.0238	-6.3708		
1-(5'-Fosforibozil)-5-amino-4-(N-sukcinokarboksiamide)-imidazol	C04823	435.1	M-H2O-H	0.0022	-21.4369						

*K_S02K = kontrola vs sukraloza 0,2 mM; †KI_S02I = kontrola inzulin vs sukraloza 0,2 mM i inzulin; ‡ KLD_S02LD = kontrola levodopa vs sukraloza 0,2 mM i levodopa; § KILD_S02ILD = kontrola inzulin levodopa vs sukraloza 0,2 mM i inzulin levodopa;

^{||}m/z = vrijednost omjera mase i naboja

Tablica 35. Prikaz metaboličkih spojeva za diferencirane stanice ljudskog neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane 24 sata s 1 mM natrijeva ciklamata i 1 sat tretirane dodatnim tretmanom inzulinom ili levodopom ili kombinacijom inzulina i levodope. Podaci su generirani nakon KEGGREST značajnih signala dobivenih MALDI-TOF MS pozitivnim i negativnim načinom snimanja.

OBILJEŽJA METABOLITA				USPOREĐENE SKUPINE					
				K_N1*		KLD_N1LD†		KILD_N1ILD‡	
Naziv spoja	KEGG ID	m/z§	Adukt	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>
11-Arahidinska kiselina	C16526	309.3	M-H	0.0005	10.8474				
3-Oksodekanoil-CoA	C05265	953.3	M+NH4	0.0141	-4.2528				
6-Acetamid-2-dioksoheksanoat	C05548	246.1	HAc-H			0.0263	-3.9368		
2-Hidroksi-6-oksonon-2,4-dien-1,9-dioat	C04479	273.1	HAc-H					0.0211	-6.7674
S-D-Lactoylglutathione	C03451	397.1	M+NH4			0.0169	3.9578		
2-(Formamid)-N1-(5'-fosforibozil)acetamidin	C04640	312.1	M-H	0.0490	2.9484				
Deoxyadenosine; 2'-Deoxyadenosine	C00559	310.1	HAc-H					0.0142	-4.1761

*K_N1 = kontrola vs natrijev ciklamat 1 mM; †KLD_N1LD = kontrola levodopa vs natrijev ciklamat 1 mM levodopa; ‡KILD_N1ILD = kontrola inzulina levodope vs natrijev ciklamat 1 mM inzulina i levodope; §m/z = vrijednost omjera mase i naboja

6. Rasprava

Umjetna sladila se od njihovog otkrića uvelike koriste kao zamjena za šećer ili ako je potpuna zamjena nemoguća, kao nadopuna šećerima. Popularnost sladila uvelike je porasla prilikom nestašica šećera u svijetu i tada se počela razmatrati upotreba sladila kao potpune zamjene za šećer posebice kod pretilih ljudi i onih koji imaju dijabetes (63). S vremenom umjetna sladila su pronašla put do djelomično ili potpuno procesuirane hrane koju svakodnevno konzumiramo. Istraživanja na sladilima prvenstveno su se fokusirala na učinak periferno od mozga, uzevši u obzir da većina teško prolazi krvno moždanu barijeru zbog svog naboja. Kasnija istraživanja su se počela fokusirati na učinak sladila na mozak i učinke koje bi sladila mogla imati na hranjenje i razine sitosti koji su od kontrolom hipokampusa, a također imaju li negativne učinke na mozak poput pojačavanja upalnih procesa (64,65). U svrhu funkcionalnih istraživanja stanični modeli mogu poslužiti za usmjereno promatranje učinka različitih sladila na određene populacije stanica mozga. Stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y nakon diferencijacije poprima obilježja dopaminergičkih neurona čija je najveća brojnost u tamnoj tvari mozga. Neuroni substantije nigre su specifično pogođeni u Parkinsonovoj neurodegenerativnoj bolesti i njihovo propadanje te progresija bolesti se za sada mogu samo usporiti tretmanima levodopom ili karbidopom (66–68).

Prema određenim studijama natrijev ciklamat i sukraloza gotovo se uopće ne metaboliziraju u tkivu čovjeka, već se neizmijenjeni izlučuju iz organizma putem urina, fešeca i znojenjem (69,70). Iz ovoga su se izvukli zaključci kako sladila ne ulaze u stanični metabolizam zbog nedostatka klasičnih konjugata ksenobiotika koji se sintetiziraju prvenstveno u jetri i bubrezima (71–73). Navedene studije su temelj za opravdano svakodnevno korištenje sladila u prehrani i njihovo obilježavanje kao relativno bezopasnima.

Mišje stanice hipotalamusa (*mHypoE-N43/5*) nakon tretmana s 20 mM sukraloze imale su značajno manje preživljenje. Dok u ovom istraživanju preživljenje diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma mjereno MTT testom, a tretirane samo sukralozom, nije značajno promijenjeno u usporedbi s netretiranom kontrolom. Međutim, stanice tretirane sukralozom i levodopa imale su značajno veće preživljenje u odnosu na netretiranu ili inzulinom tretiranu kontrolnu skupinu. Takav bi učinak levodope trebao biti neobičan ako se uzme u obzir istraživanje u kojem dopamin ima citotoksičan učinak na istu staničnu liniju zbog povećanja oksidativnog stresa u stanici,

proteasomske inaktivacije i nakupljanja alfa-sinukleina potencijalni čimbenici (74,75). Međutim, to je rezultat 24-satnog izlaganja stanica ljudskog neuroblastoma dopaminu.

Studije obavljene na glodavcima i nehumanim primatima pokazale su da natrijev ciklamat, odnosno njegov metabolit cikloheksilamin, koji nastaje pod utjecajem crijevne mikrobiote, uzrokuje tumore mokraćnog sustav, adenom štitnjače i karcinom kolona (76–79). Smatra se da cikloheksilamin nastaje u probavnom sustavu čovjeka pod utjecajem crijevne flore s tim da nije potvrđena kancerogenost ovog spoja kod ljudi. Količina nastalog cikloheksilamin se razlikuje od čovjeka do čovjeka zbog različitog mikrobioma (70,80). Stoga je za pretpostaviti je da je mehanizam nastanak tumora pod utjecajem cikloheksilamin specifičan za životinje ili se potencijalna kancerogenost u čovjeka nije detaljno istražila. Aspartam, natrijev ciklamat, acesulfam K i natrijev saharin imaju citotoksičan, mutageni i genotoksičan učinak na dvije stanične linije debelog crijeva (Caco-2 i HT-2) i staničnu liniju bubrega (HEK-293) (81). U ovom istraživanju, natrijev ciklamat je na preživljenje stanica imao o koncentraciji ovisan učinak. Najmanja koncentracija natrijeva ciklamata je značajno povećala preživljenje stanica neovisno o dodatnom tretmanu inzulinom ili levodopom.

Tretman diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma s tri koncentracije sladila i dodatnim tretmanima inzulinom i levodopom rezultiralo je neočekivanim metaboličkim odgovorima. Sukraloza samostalno primijenjena u sve tri koncentracije (0,2 mM, 2 mM i 20 mM) nije uzrokovala nikakve značajnije promjene u razinama AKT proteina ako ih se uspoređi s netretiranim stanicama. S druge strane natrijev ciklamat je uzrokovao gotovo linearan postupan pad razina AKT proteina s porastom primijenjene koncentracije sladila. Pad razina AKT proteina je obilježje aktivacije uzvodne signalne mreže prvenstveno inzulinske signalizacije ili signalizacije IGF1. Kratkoročno se ovo događa nakon aktivacije navedenih puteva iz dva moguća razloga. Prvi razlog je proteoliza kao dio mehanizma negativne povratne sprege čiji je cilj utišati aktivirani put i tako spasiti stanice od dugoročnog stvaranja inzulinske rezistencije i posljedične metaboličke katastrofe, a drugi razlog je fosforilacija molekule zbog čega protutijelo teže prepoznaje epitop (82–84).

Isti je obrazac uočen kada se doda inzulin u sladilima netretiranu staničnu kulturu. U ovom slučaju je inzulin poslužio kao pozitivna kontrola kako bi se moglo procijeniti koliko sladila potentnije aktiviraju ili gase unutarstaničnu signalizaciju u odnosu na hormon čija je to primarna fiziološka funkcija (85,86). Stanice koje su prethodno tretirane sukralozom na inzulin su reagirale

padom razine AKT proteina za 20 % u odnosu na inzulinom tretiranu kontrolu. Razlog tomu može biti povećana ubikvitinacija proteina i posljedično njegova razgradnja kao odgovor stanica na povećanje proizvodnje i akumulacije mitohondrijalnih reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) (87). U slučaju natrijeva ciklamata ništa značajno se nije dogodilo s razinama AKT proteina i za pretpostaviti je kako ova dva sladila imaju drugačiju interakciju s inzulinskim signalnim putem.

Levodopa je samostalno ili u kombinaciji s inzulinom pri nižim koncentracijama tretmana ciklamatom rezultirala povećanjem razina AKT proteina. Povećanje razina AKT proteina inicijalno se čini pozitivnim ishodom tretmana. Uzme li se u obzir da malo povećanje razina AKT proteina rezultira velikim povećanjem njegovog aktivnog oblika pitanje je kolika šteta može nastati kao posljedica toga jer su visoke razine fosforilacije AKT zabilježene u tumorima (88,89). Na stanice tretirane ciklamatom sama levodopa nije imala značajniji učinak na AKT, no kombinacija inzulina i levodope kao dodatni tretman rezultiralo je sličnim odgovorom kao i u slučaju sukraloze što indicira kako kombinacija levodope i inzulina imaju značajan učinak na stanični metabolizam neurona substantije nigre mozga što je prethodno opaženo kod ljudi s Parkinsonovom bolesti i dijabetesom tipa 2 (90).

Za procjenu aktivnosti signalnog puta inzulina i IGF1 potrebno je promotriti razine fosforilirane i aktivne forme AKT proteina. Fosforilacija serina 473 se rijetko događa neovisno. Prvo fosfoinozitin ovisna kinaza 1 fosforilira treonin na poziciji 308 i tek nakon toga mTORC1 i 2 (engl. *mammalian target of rapamycin kinase 1 and 2*) kompleks može fosforilirati AKT na serinu 473. Ova dvostruka fosforilacija u potpunosti aktivira AKT i tek takav može djelovati na nizvodne signalizacijske molekule (91,92). Tretman samo sladilima je potaknuo fosforilaciju AKT proteina i njegovu potpunu aktivaciju unatoč tome što u mediju nije bilo prisutnih hormona ili spojeva koji bi mogli preko membranskog receptora odraditi aktivaciju. Stupanj aktivacije samo sladilima je oko 20 % u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovo korelira s opaženom aktivacijom AKT pomoću inzulina u kontrolnoj skupini. Zanimljivo je kako su prethodna istraživanja pokazala izostanak učinka natrijeva ciklamata na fosforilaciju AKT proteina (93–95). Ovaj pronalazak se može objasniti činjenicom da korištene stanice imaju neuralna obilježja i time drugačiji metabolizam šećera koji nije direktno ovisan o inzulinu. Sukraloza s druge strane u prethodnim istraživanjima se pokazala učinkovitom u gašenju inzulinskog signalnog puta u adipocitima pri čemu su razine AKT proteina fosforiliranog na serinu 473 značajno smanjene (94). Potonji ishodi

su u suprotnosti od promotrenih u ovom istraživanju. Razlog tomu može biti korištenje ljudske stanične linije, a ne štakora kao modelnog sustava za ispitivanje učinka sukraloze. Stanična linija nikada neće moći proizvesti sve konjugate ksenobiotika koje može živa životinja. Također je potrebno uzeti u obzir činjenicu kako ne bi bilo prvi puta da eksperimenti na glodavcima pokažu jedno, a testiranje na ljudima ili ljudskim stanicama drugo. Dobar primjer toga je talidomid koji u glodavcima nije proizveo nepovoljne učinke u trudnoći, dok je primjenom na ljudima doveo do pojave fokomelije (96). Još jedan razlog različitog bi mogao ležati u činjenici da su štakori organizam sa središnjim živčanim sustavom koji je u stanju regulirati sekreciju perifernih hormona temeljem osjetljivih podražaja poput slatkoće na jeziku (97,98). Nasuprot tome je stanična kultura koja se mora vlastitim metabolizmom izboriti s dodanim sladilima.

Inzulin kao dodatni tretman imao je očekivanu učinak na kontrolnu skupinu stanice jer je porasla razina fosforiliranog AKT proteina (99,100). Neočekivan rezultat se pojavio u skupinama koje su tretirane sukralozom i dodatno inzulinom. U tim skupinama je došlo do značajnog pada u razinama fosforilacije i posljedično aktivnosti AKT proteina. Ovo je specifično za sukralozu. Kod natrijevog ciklamata taj učinak nije opažen i vjerojatno s dobrim razlogom jer dodatak natrijeva ciklamata tek u najvećoj koncentraciji utječe na povećanje razina pAKT. Sukraloza ima isti ili veći učinak pri svim koncentracijama posebice pri najnižim od 0,2 mM. Svaki signalni put o kojem ovisi preživljenje stanice se mora usko regulirati. Nemogućnost regulacije metaboličkih puteva vodi u staničnu smrt kao dugoročnu posljedicu, a ako stanica dovoljno dugo preživi veliki je potencijal nastanka tumorskih obilježja. Pretpostavka za razlog ovog pada razina pAKT bi mogao biti u tome da regulacijski mehanizmi koji defosforiliraju ili ubikvitiniraju pAKT nisu oštećeni. Ovo se vidi iz razina ne-fosforiliranog AKT koji pada s primjenom najniže koncentracije sukraloze, a koja ujedno i najjače aktivira fosforilaciju istog proteina.

Levodopa kada se kao dodatni tretman primjeni na stanice koje su tretirane sukralozom ne uvodi neke značajne primjene pogleda fosforilacije AKT proteina. Levodopa se metabolizira u dopamin koji s druge strane kada se veže na svoj receptor aktivira uzvodni dio inzulinskog signalnog puta koji im je zajednički (101–103). Ova interakcija dva signalna puta s relativno očuvanim mehanizmima regulacije može objasniti zašto nije došlo do značajnog porasta u aktivaciji AKT. Dok primjena natrijeva ciklamata dovodi do porasta fosforilacije AKT proteina. Nekoliko je mogućnosti ovog opaženog učinka. Prva je da ciklamat povećava katalitičku brzinu

DOPA dekarboksilaze čime povećava količinu dopamina i aktivaciju PI3K. Mehanizam za ovo bi bilo potrebno ispitati titracijom ciklamata na smjesu čistog enzima i supstrata. Druga mogućnost je ciklamat djeluje na mehanizme kojim stanica regulira signalni put i time onemogućuje njegovo gašenje. Potonje je vjerojatnije jer razine ne-fosforiliranog AKT ne padaju niti rastu značajno od onih u kontrolnim skupinama.

Najveći učinak na fosforilaciju AKT ima kombinacija dodatnih tretmana inzulinom i levodopom u slučaju oba sladila uz razliku da je učinak znatno naglašeniji kod natrijeva ciklamata. Povećanje je u odnosu na kontrolu oko šest puta pri najvećoj koncentraciji natrijeva ciklamata. Kada se sve sagleda levodopa i inzulin imaju sinergistički učinak na aktivaciju inzulinske signalizacije. Zanimljivo je što sukraloza, iako je prethodnim istraživanjima pokazan njezin učinak na lučenje inzulina, nema toliki učinak na finu kontrolu povratne sprege fosforilacije AKT proteina. Dok natrijev ciklamat remeti stabilnost i pali inzulinsku signalnu mrežu gotovo nekontrolirano (104,105).

Nizvodno od inzulinskog signalnog puta se nalaze GSK3 α i GSK3 β koji reguliraju aktivnost glikogen sintetaze, ekspresiju gena i translaciju proteina. Od ova dva proteina GSK3 β izoforma je važnija za stabilnost signalne mreže i stanično preživljenje (106). Aktivacija inzulinskog signalnog puta će smanjiti aktivnost GSK3 što će se očitovati kao smanjenje u razinama fosforilacije. Na GSK3 α , natrijev ciklamat nije imao nikakav značajan učinak dok je na GSK3 β izoformu tretman ciklamatom i sukralozom imali sličan učinak odnosno tretman sladilima neovisno o koncentraciji povećao je količine proteina u stanicama. Sličan učinak na beta podjedinice je imala i levodopa dok kombinacija levodopa s inzulinom je spustila protein na razine iz kontrolnih skupina. Fiziološka funkcija GSK3 α je relativno nepoznata jer delecija njezina gena ne uzrokuje značajne patološke promjene u metabolizmu. Najviše je eksprimirana u živčanom tkivu gdje ima važnu ulogu u održavanju i formaciji astrocita zajedno s GSK3 β (107,108). Fosforilacija GSK3 α je značajno izmijenjena pri najvećoj koncentraciji sukraloze i nakon tretmana inzulinom. Sve ostale skupine imaju ovaj trend snižavanja fosforiliranosti odnosno smanjene aktivnosti nakon stimulacije inzulinom. Ovaj odgovor fosforilacije je očekivan i zapravo smanjenje aktivnosti enzima je dio normalnog fiziološkog odgovora. Ono što nije očekivano jest 50 % smanjenje fosforiliranosti pri najvećoj koncentraciji sukraloze i generalan pad ukupne količine proteina unutar stanica. Razlog snižavanja razina nefosforilirane forme proteina nije poznat no

moguće bi ga bilo istražiti stvaranjem specifičnog kondicionalnog knockout modela na GSK3 α te proučiti gdje se gube interakcije kada nedostaje kinaza (109).

Natrijev ciklamat ima nešto drugačiji učinak na aktivaciju GSK3 α jer neovisno o koncentraciji ako se kombinira s inzulin i levodopa dolazi do pojačane fosforilacije enzima i njegove aktivacije. Samo inzulin ili levodopa imaju očekivan učinak neovisno o koncentraciji ciklamata i fosforiliranost enzima, a time i njegova aktivnost se smanjuju. Ovo je vrlo vjerojatno posljedica koju ima prekomjerna aktivnost AKT koji fosforilira GSK3, jer je u ovoj skupini zabilježena šesterostruko povećanje u fosforilaciji AKT proteina. Iako prekomjerna aktivnost AKT bi trebala dovesti do značajnog smanjenja u fosforilaciji GSK3 α , postoji mogućnost da je jedan od ciljeva mTOR signalnog puta te služi podešavanju signalizacije iako nije u potpunosti jasna uloga natrijeva ciklamata u ovome (110). Razine GSK3 β se ne mijenjaju značajno u kontrolnim skupinama dodatkom inzulina, levodope ili njihovom kombinacijom, te se može reći da fiziološki prisutne molekule nemaju značajna učinak na osnovne razine proteina. Na fosforilaciju GSK3 β dodatni tretmani djeluju smanjujući ih što je opet fiziološki očekivano jer aktivacija inzulinskog signalnog puta bi trebala početi gasiti GSK3 β (111). Zanimljivo je za vidjeti da su tretmani sukralozom ili ciklamatom podigli osnovne razine GSK3 β proteina u stanici. Ovo se vrlo vjerojatno odvija preko regulacije genske ekspresije jer je tretman sladilima traje dovoljno da potakne promjene u genskoj ekspresiji i da one postanu vidljive u proteinskom profilu (112–114). Prethodna istraživanja su ukazala na modulatorni učinak aspartama i acesulfama K u genskoj ekspresiji kod prokariota, a također su potvrđeni učinci na horizontalni transfer gena u *E. coli* (115,116). Poticanje promjene u ekspresiji gena sladilima kod eukariota je značajno samo za sebe jer se ne zna čitav niz promjena koje uvodi konzumacija sladila. S obzirom na to da eukarioti koji primarno konzumiraju sladila su ljudi postavlja se i pitanje koliko su ona dugoročno neškodljiva. Dolazi li do promjena u genskoj ekspresiji kod eukariota nakon tretmana sukralozom i ciklamatom moglo bi se provjeriti kvantitativnim PCR-om za specifične gene ili RNA sekvenciranjem. Ovaj je učinak također prisutan uz levodopu koja ne vraća fiziološki promotrene razine kako to primjerice čini tretman inzulinom. Vjerojatan razlog tomu je što inzulin sa svojom nizvodnom signalnom mrežom regulira ekspresiju gena i translaciju mRNA dok dopamin koji nastaje iz levodope ima relativno ograničavajući učinak na te procese (117). Na fosforilaciju i gašenje GSK3 β signala sladila nemaju toliki učinak, odnosno razine proteina se zadržavaju na vrijednostima promotrenima u kontrolnim skupinama odnosno sladila neće posebno djelovati na gašenje GSK3 β . Izuzetak iz ovoga su stanice

tretirane s 20 mM sukraloze i inzulinom gdje je došlo do 50 % pada u fosforilaciji GSK3 β . Ovo je suprotno od očekivanog, posebice u slučaju ciklamata i dodatnog tretmana s inzulinom i levodopom. Zbog prekomjerne aktivacije AKT proteina fosforilacijom za pretpostaviti je kako će GSK3 β biti manje fosforiliran, odnosno manje aktivan u odnosu na kontrolne skupine no to se nije dogodilo. Postaje očito kako je u određenim slučajevima došlo do deregulacije signalne mreže. Pozitivna strana ove deregulacije jest činjenica kako se ona dogodila samo pri koncentracijama koje nisu normalno prisutne prilikom konzumacije sladila. Također mjesta na kojima sladila djeluju daje uvid u potencijal koji imaju kao tretman za bolesti SŽS koje u podlozi imaju inzulinsku rezistenciju. Sladila mogu upaliti inzulinski signalni put unutar stanice i tako potencijalno spasiti stanice od apoptoze što je vidljivo iz rezultata MTT testa (117,118).

Receptor za inzulinu sličan faktor rasta (IGF1R) ujedino je i receptor za inzulin te se oba receptora ponašaju vrlo slično nakon vezivanja svog supstrata. Nakon što se supstrat veže za receptor i dođe do transfosforilacije tirozina doći će do njegove aktivacije ubrzo nakon toga uvlačenja u stanicu te recikliranja ili proteolize (119–122). Tretmani sladilima nisu značajno promijenili razine receptora u stanici i može se reći da nemaju direktnog učinka na receptor što je i očekivano s obzirom na to da nemaju strukturnu sličnost poznatim supstratima.

Dodatni tretmani su imali značajan učinak na razine receptora. Inzulin i levodopa su imali samostalan učinak na spuštanje razina receptora. Sukraloza je imala sinergističku učinak u stanicama tretiranim dodatno inzulinom te je došlo do još većeg smanjenja razina receptora neovisno o koncentraciji. Levodopa je imala sličan učinak kao i inzulin, ali samo pri najnižoj koncentraciji sukraloze. Natrijev ciklamat je svoj učinak na razine receptora pokazao samo kada su stanice dodatno tretirane levodopom gdje je došlo do dodatnog smanjenja razina receptora. Razlog zbog kojeg dolazi do sniženja razina receptora je očit u slučaju kada je prisutan inzulin. Za inzulin je ovo očekivano jer je on jedan od supstrata za receptor te dio ukupne količine prisutnih receptora odlazi u proteolizu nakon aktivacije (123). postoji mogućnost kako sukraloza potiče proteine koji normalno označavaju za ubikvitinaciju prethodno aktivirane receptore. Neki od tih proteina su beta-arestin/MDM2 kompleks ili Grb-10/Nedd4 kompleks za koje je pokazano kako sudjeluju u tom procesu po aktivaciji. Ubikvitinacija receptora zahtjeva samo aktivnost tirozin kinaze, ali ne i fosforilaciju AKT proteina (124). Način kako bi sladilo moglo potaknuti ovo je preko mTOR puta koji se može aktivirati u slučaju porasta ROS-a proizvedenih u mitohondrijima.

Time bi se potaknula čitava kaskada i povećala količina kinaza, čija je funkcija utišavanje i stabilizacija staničnog metabolizma (125,126). Ovo se može također vidjeti iz rezultata MTT-testa s obzirom da nema povećanja stanične smrti već naprotiv stanice bolje rastu i mitohondrijska aktivnost je veća što svakako rezultira povećanom proizvodnjom ROS-a. Stvarni mehanizma utjecaja bi trebalo ispitati unutarstaničnom aktivacijom jedne po jedne molekule signalnog puta. Ovime bi se moglo ispitati postoji li dodatni mehanizam aktivacije recikliranja receptora ili sladila direktno utječu na receptor.

Sukraloza i natrijev ciklamat u kombinaciji s inzulinom i levodopom sprječavaju apoptozu diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma u određenim koncentracijama putem inzulinskog signalnog puta te zato imaju potencijal u primjeni kod neurodegenerativnim bolestima. Međutim, potrebno je istražiti učinke ovih sladila na ostale metaboličke puteve (87,127).

7. Zaključci

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. tretman diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma s 0,2 mM sukraloze povećava stanično preživljenje u odgovoru na tretman levodopom;
2. tretman diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma s 1 mM natrijeva ciklamata povećava stanično preživljenje u odgovoru na tretman levodopom i inzulinom;
3. tretman diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma s 100 mM natrijeva ciklamata smanjuje stanično preživljenje;
4. tretman sukralozom neovisno o koncentraciji aktivira inzulinski signalni put stanica ljudskog neuroblastoma u odgovoru na tretman inzulinom i levodopom;
5. tretman natrijevim ciklamatom neovisno o koncentraciji aktivira inzulinski signalni put stanica ljudskog neuroblastoma;
6. tretman natrijevim ciklamatom neovisno o koncentraciji aktivira inzulinski signalni put stanica ljudskog neuroblastoma u odgovoru na tretman inzulinom i levodopom.

8. Sažetak

Učinak umjetnih sladila na inzulinski signalni put stanica ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y

Uvod: Neurodegenerativne bolesti predstavljaju sve veći zdravstveni problem u populacijama zemalja razvijenog svijeta. Nekoliko istraživanja ukazuje na povezanost inzulinske rezistencije s razvojem Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Sukraloza podiže razinu glukoze i inzulina kod pretilih ženama. Vrlo male doze natrijeva ciklamata mogu poremetiti diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta.

Ciljevi: Ciljevi ovog istraživanja su bili ispitati učinke tretmana triju koncentracija natrijeva ciklamata (1 mM, 10 mM, 100 mM) i sukraloze (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) samostalno, te u kombinacijama s inzulinom i levodopom na preživljenje, inzulinski signalni put i metabolički odgovor diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma.

Materijali i metode: Diferencirane SH-SY5Y stanice su tretirane sladilima i dodatnim tretmanima. Citotoksičan učinak tretmana određen je MTT testom. Aktivnost inzulinskog signalnog puta ispitala se Western blot metodom. Ukupni učinak tretmana na metabolički odgovor tretiranih stanica ispitan je MALDI-TOF MS metodom.

Rezultati: Stanice tretirane sukralozom u sve tri koncentracije gdje je kao dodatni tretman korištena i levodopa imale su značajno veće preživljenje u odnosu na netretiranu ili inzulinom tretiranu kontrolnu skupinu. Natrijev ciklamat je na preživljenje stanica imao o koncentraciji ovisan učinak. Najmanja koncentracija značajno je povećala preživljenje stanice neovisno o dodatnom tretmanu inzulinom ili levodopom.

Zaključci: Sukraloza i natrijev ciklamat u kombinaciji s inzulinom i levodopom sprječavaju apoptozu diferenciranih stanica ljudskog neuroblastoma u određenim koncentracijama putem inzulinskog signalnog puta. Međutim, potrebno je istražiti učinak ovih sladila na ostale metaboličke puteve.

Ključne riječi: nenutritivni zaslađivači; tehnika stanične kulture; inzulin; levodopa

9. Summary

Effects of artificial sweeteners on the insulin signaling pathway of human neuroblastoma cells SH-SY5Y

Introduction: Neurodegenerative diseases represent an increasing health problem in the populations of countries in the Western world. Several studies indicate a connection between insulin resistance and the development of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Sucralose raises glucose and insulin levels in obese women. Very small doses of sodium cyclamate can disrupt the differentiation and proliferation of osteoblasts.

Objectives: The objectives of this research were to examine the effects of three concentrations of sodium cyclamate (1 mM, 10 mM, 100 mM) and sucralose (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) independently and in combination with insulin and levodopa on survival, insulin signaling pathway and metabolic response of differentiated human neuroblastoma cells.

Material and methods: Differentiated SH-SY5Y cells were treated with sweeteners and additional treatments. The cytotoxic effect of the treatment was determined by the MTT test. The activity of the insulin signaling pathway was examined using the Western blot method. The overall effect on the metabolic response of the treated cells was determined by the MALDI-TOF MS method.

Results: Cells treated with sucralose in all three concentrations, where levodopa was also used as an additional treatment, had significantly higher survival compared to the untreated or insulin-treated control group. Sodium cyclamate had a concentration-dependent effect on SH-SY5Y cells survival. The lowest concentration significantly increased cell survival independent of additional treatment with insulin or levodopa.

Conclusion: Sucralose and sodium cyclamate in combination with insulin and levodopa prevent apoptosis of differentiated human neuroblastoma cells in certain concentrations via the insulin signaling pathway. However, it is necessary to investigate the effect of these sweeteners on other metabolic pathways.

Key words: non-nutritive sweeteners; cell culture techniques; insulin; levodopa

10. Literatura

1. Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018.;10(4):a033118.
2. Letenneur L, Larrieu S, Barberger-Gateau P. Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2004.;58(2):95–9.
3. Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging.* 2004.;25(5):641–50.
4. Kivipelto M, Rovio S, Ngandu T, Kåreholt I, Eskelinen M, Winblad B, i ostali. Apolipoprotein E epsilon4 magnifies lifestyle risks for dementia: a population-based study. *J Cell Mol Med.* 2008.;12(6B):2762–71.
5. Cedazo-Mínguez A, Cowburn RF. Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med.* 2001.;5(3):254–66.
6. Liu G, Yao L, Liu J, Jiang Y, Ma G, Genetic and Environmental Risk for Alzheimer's disease (GERAD1) Consortium, i ostali. Cardiovascular disease contributes to Alzheimer's disease: evidence from large-scale genome-wide association studies. *Neurobiol Aging.* 2014.;35(4):786–92.
7. Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med Berl Ger.* 2004.;82(8):510–29.
8. Almeida OP, Hulse GK, Lawrence D, Flicker L. Smoking as a risk factor for Alzheimer's disease: contrasting evidence from a systematic review of case-control and cohort studies. *Addict Abingdon Engl.* 2002.;97(1):15–28.
9. Vanacore N, Bonifati V, Fabbrini G, Colosimo C, Marconi R, Nicholl D, i ostali. Smoking habits in multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. European Study Group on Atypical Parkinsonisms. *Neurology.* 2000.;54(1):114–9.

10. Hong CT, Chen KY, Wang W, Chiu JY, Wu D, Chao TY, i ostali. Insulin Resistance Promotes Parkinson's Disease through Aberrant Expression of α -Synuclein, Mitochondrial Dysfunction, and Deregulation of the Polo-Like Kinase 2 Signaling. *Cells*. 2020.;9(3):740.
11. Misiak B, Leszek J, Kiejna A. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease--the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity. *Brain Res Bull*. 2012.;89(3-4):144-9.
12. Samaras K, Sachdev PS. Diabetes and the elderly brain: sweet memories? *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2012.;3(6):189-96.
13. Viola KL, Klein WL. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015.;129(2):183-206.
14. Kalaria RN, Ballard C. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1999.;13 Suppl 3:S115-123.
15. Ueno M, Chiba Y, Matsumoto K, Nakagawa T, Miyanaka H. Clearance of beta-amyloid in the brain. *Curr Med Chem*. 2014.;21(35):4085-90.
16. Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, i ostali. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012.;123(1):1-11.
17. de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2005.;7(1):45-61.
18. Lee S, Tong M, Hang S, Deochand C, de la Monte S. CSF and Brain Indices of Insulin Resistance, Oxidative Stress and Neuro-Inflammation in Early versus Late Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Park*. 2013.;3:128.
19. Benedict C, Frey WH, Schiöth HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Exp Gerontol*. 2011.;46(2-3):112-5.

20. Reger MA, Watson GS, Green PS, Wilkinson CW, Baker LD, Cholerton B, i ostali. Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology*. 2008.;70(6):440–8.
21. Hogg E, Athreya K, Basile C, Tan EE, Kaminski J, Tagliati M. High Prevalence of Undiagnosed Insulin Resistance in Non-Diabetic Subjects with Parkinson’s Disease. *J Park Dis*. 2018.;8(2):259–65.
22. Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res*. 2003.;964(1):107–15.
23. Unger JW, Livingston JN, Moss AM. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol*. 1991.;36(5):343–62.
24. Fiory F, Mirra P, Nigro C, Pignalosa FC, Zatterale F, Ulianich L, i ostali. Role of the HIF-1 α /Nur77 axis in the regulation of the tyrosine hydroxylase expression by insulin in PC12 cells. *J Cell Physiol*. 2019.;234(7):11861–70.
25. Morris JK, Bomhoff GL, Gorres BK, Davis VA, Kim J, Lee PP, i ostali. Insulin resistance impairs nigrostriatal dopamine function. *Exp Neurol*. 2011.;231(1):171–80.
26. Liu Z, Wang Y, Zhao W, Ding J, Mei Z, Guo L, i ostali. Peptide derived from insulin with regulatory activity of dopamine transporter. *Neuropharmacology*. 2001.;41(4):464–71.
27. Gandhi KR, Saadabadi A. Levodopa (L-Dopa). U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [Datum pristupa: 9. svibanja 2022.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482140/>
28. Smith JL, Ju JS, Saha BM, Racette BA, Fisher JS. Levodopa with carbidopa diminishes glycogen concentration, glycogen synthase activity, and insulin-stimulated glucose transport in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2004.;97(6):2339–46.

29. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017.;12(1):10.
30. Fiory F, Perruolo G, Cimmino I, Cabaro S, Pignalosa FC, Miele C, et al. The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. *Front Neurosci.* 2019.;13:868.
31. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.* 2002.;45(11):1475–83.
32. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994.;269(1):1–4.
33. Petruzzelli LM, Ganguly S, Smith CJ, Cobb MH, Rubin CS, Rosen OM. Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982.;79(22):6792–6.
34. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991.;352(6330):73–7.
35. Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* 2003.;15(5):455–62.
36. Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta.* 2007.;1773(8):1150–60.
37. Wada A. GSK-3 inhibitors and insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. *Front Biosci Landmark Ed.* 2009.;14(4):1558–70.
38. Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front Mol Neurosci.* 2014.;7:28.
39. DuBois GE, Prakash I. Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012.;3:353–80.
40. Rippe JM, Angelopoulos TJ. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. *Nutrients.* 2016.;8(11):E697.

41. Pang MD, Goossens GH, Blaak EE. The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Front Nutr.* 2021.;7:598340.
42. Erbaş O, Erdoğan MA, Khalilnezhad A, Solmaz V, Gürkan FT, Yiğittürk G, i ostali. Evaluation of long-term effects of artificial sweeteners on rat brain: a biochemical, behavioral, and histological study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018.;32(6):e22053.
43. González-Domínguez R, Castellano-Escuder P, Carmona F, Lefèvre-Arbogast S, Low DY, Du Preez A, i ostali. Food and Microbiota Metabolites Associate with Cognitive Decline in Older Subjects: A 12-Year Prospective Study. *Mol Nutr Food Res.* 2021.;65(23):2100606.
44. Food and Drug Administration, HHS. Food labeling: health claims; dietary noncariogenic carbohydrate sweeteners and dental caries. Final rule. *Fed Regist.* 2006.;71(60):15559–64.
45. Gardner C, Wylie-Rosett J, Gidding SS, Steffen LM, Johnson RK, Reader D, i ostali. Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives. *Diabetes Care.* 2012.;35(8):1798–808.
46. Nutrition C for FS and A. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States. FDA [Internet]. 20. veljača 2020. [Datum pristupa: 9. svibanja 2022.]; Dostupno na: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>
47. WHO | JECFA [Internet]. [Datum pristupa: 9. svibanja 2022.]. Dostupno na: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/2340>
48. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Safety of the proposed extension of use of sucralose (E 955) in foods for special medical purposes in young children. *EFSA J.* 2016.;14(1):4361.
49. Bueno-Hernández N, Esquivel-Velázquez M, Alcántara-Suárez R, Gómez-Arauz AY, Espinosa-Flores AJ, de León-Barrera KL, i ostali. Chronic sucralose consumption induces elevation of serum insulin in young healthy adults: a randomized, double blind, controlled trial. *Nutr J.* 2020.;19(1):32.

50. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, i ostali. Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*. 2009.;4(4):e5106.
51. Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton SS, de Araujo IE. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci*. 2009.;3:12.
52. Brown RJ, Walter M, Rother KI. Effects of diet soda on gut hormones in youths with diabetes. *Diabetes Care*. 2012.;35(5):959–64.
53. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, i ostali. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007.;104(38):15069–74.
54. Pepino MY, Tiemann CD, Patterson BW, Wice BM, Klein S. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes Care*. 2013.;36(9):2530–5.
55. Bopp BA, Sonders RC, Kesterson JW. Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. *Crit Rev Toxicol*. 1986.;16(3):213–306.
56. Chen Z, Chen G, Zhou K, Zhang P, Ren X, Mei X. Toxicity of food sweetener-sodium cyclamate on osteoblasts cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019.;508(2):507–11.
57. SH-SY5Y | ATCC [Internet]. [Datum pristupa: 8. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/crl-2266>
58. MTT assay protocol | Abcam [Internet]. [Datum pristupa: 8. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.abcam.com/kits/mtt-assay-protocol#assay-protocol>
59. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, i ostali. Cell Viability Assays. U: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, i ostali, urednici. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [Datum pristupa: 6. lipnja 2022.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

60. 4110065A.pdf [Internet]. [Datum pristupa: 8. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>
61. The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | MBL Life Science -JAPAN- [Internet]. [Datum pristupa: 5. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html>
62. Sodium dodecyl sulfate in SDS-PAGE - Labster Theory [Internet]. Dostupno na: https://theory.labster.com/sodium_dodecyl_sulfate/
63. Saccharin [Internet]. American Chemical Society. [Datum pristupa: 6. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/s/saccharin.html>
64. Erbaş O, Erdoğan MA, Khalilnezhad A, Solmaz V, Gürkan FT, Yiğittürk G, i ostali. Evaluation of long-term effects of artificial sweeteners on rat brain: a biochemical, behavioral, and histological study. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018.;32(6):e22053.
65. Van Opstal AM, Hafkemeijer A, van den Berg-Huysmans AA, Hoeksma M, Mulder TheoPJ, Pijl H, i ostali. Brain activity and connectivity changes in response to nutritive natural sugars, non-nutritive natural sugar replacements and artificial sweeteners. *Nutr Neurosci*. 2021.;24(5):395–405.
66. Fox SH, Lang AE. Motor and non-motor fluctuations. U: Koller WC, Melamed E, urednici. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2007 [Datum pristupa: 6. srpanja 2022.]. str. 159–84. (Parkinson's Disease and Related Disorders, Part II; sv. 84). Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0072975207840395>
67. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*. 2017.;12(1):10.
68. Parkinson disease [Internet]. [Datum pristupa: 6. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>

69. Jenner M r., Smithson A. Physicochemical Properties of the Sweetener Sucralose. *J Food Sci.* 1989.;54(6):1646–9.
70. Renwick AG, Thompson JP, O’Shaughnessy M, Walter EJ. The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004.;196(3):367–80.
71. Roberts A, Renwick AG, Sims J, Snodin DJ. Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food Chem Toxicol.* 2000.;38:31–41.
72. Eichelbaum M, Hengstmann JH, Rost HD, Brecht T, Dengler HJ. Pharmacokinetics, cardiovascular and metabolic actions of cyclohexylamine in man. *Arch Für Toxikol.* 1974.;31(3):243–63.
73. Canada E and CC. Screening assessment - sodium cyclamate and cyclohexylamine [Internet]. 2022 [Datum pristupa: 9. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/evaluating-existing-substances/screening-assessment-sodium-cyclamate-cyclohexylamine.html>
74. Banerjee K, Munshi S, Sen O, Pramanik V, Roy Mukherjee T, Chakrabarti S. Dopamine Cytotoxicity Involves Both Oxidative and Nonoxidative Pathways in SH-SY5Y Cells: Potential Role of Alpha-Synuclein Overexpression and Proteasomal Inhibition in the Etiopathogenesis of Parkinson’s Disease. *Park Dis.* 2014.;2014:878935.
75. Lai CT, Yu PH. Dopamine- and l-β-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (l-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y Cells: Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochem Pharmacol.* 1997.;53(3):363–72.
76. Price JM, Biava CG, Oser BL, Vogin EE, Steinfeld J, Ley HL. Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. *Science.* 1970.;167(3921):1131–2.
77. Brantom PG, Gaunt IF, Grasso P. Long-term toxicity of sodium cyclamate in mice. *Food Cosmet Toxicol.* 1973.;11(5):735–46.

78. Bickel MH, Burkard B, Meier-Strasser E, van den Broek-Boot M. Entero-bacterial formation of cyclohexylamine in rats ingesting cyclamate. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* 1974.;4(7):425–39.
79. Takayama S, Renwick AG, Johansson SL, Thorgeirsson UP, Tsutsumi M, Dalgard DW, i ostali. Long-Term Toxicity and Carcinogenicity Study of Cyclamate in Nonhuman Primates. *Toxicol Sci.* 2000.;53(1):33–9.
80. Renwick AG. The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* 1986.;16(10–11):1057–71.
81. van Eyk AD. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug Chem Toxicol.* 2015.;38(3):318–27.
82. Lu Z, Hunter T. Degradation of Activated Protein Kinases by Ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2009.;78:435–75.
83. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017.;169(3):381–405.
84. Mandell JW. Phosphorylation State-Specific Antibodies. *Am J Pathol.* 2003.;163(5):1687–98.
85. van de Venter M, Roux S, Bungu LC, Louw J, Crouch NR, Grace OM, i ostali. Antidiabetic screening and scoring of 11 plants traditionally used in South Africa. *J Ethnopharmacol.* 2008.;119(1):81–6.
86. A. Pringle N, Venter M van de, C. Koekemoer T. Comprehensive in vitro antidiabetic screening of *Aspalathus linearis* using a target-directed screening platform and cellomics. *Food Funct.* 2021.;12(3):1020–38.
87. Kundu N, Domingues CC, Patel J, Aljishi M, Ahmadi N, Fakhri M, i ostali. Sucralose promotes accumulation of reactive oxygen species (ROS) and adipogenesis in mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020.;11:250.

88. Yang ZY, Di MY, Yuan JQ, Shen WX, Zheng DY, Chen JZ, i ostali. The prognostic value of phosphorylated Akt in breast cancer: a systematic review. *Sci Rep*. 2015.;5(1):7758.
89. Song HP, Chu ZG, Zhang DX, Dang YM, Zhang Q. PI3K–AKT Pathway Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia-Induced Apoptosis by MitoKATP-Mediated Mitochondrial Translocation of pAKT. *Cell Physiol Biochem*. 2018.;49(2):717–27.
90. Fiory F, Perruolo G, Cimmino I, Cabaro S, Pignalosa FC, Miele C, i ostali. The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. *Front Neurosci* [Internet]. 2019. [Datum pristupa: 9. srpanja 2022.];13. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00868>
91. Hart JR, Vogt PK. Phosphorylation of AKT: a Mutational Analysis. *Oncotarget*. 2011.;2(6):467–76.
92. Wei Y, Zhou J, Yu H, Jin X. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019.;83(3):429–35.
93. Simon BR, Parlee SD, Learman BS, Mori H, Scheller EL, Cawthorn WP, i ostali. Artificial Sweeteners Stimulate Adipogenesis and Suppress Lipolysis Independently of Sweet Taste Receptors*. *J Biol Chem*. 2013.;288(45):32475–89.
94. Sánchez-Tapia M, Martínez-Medina J, Tovar AR, Torres N. Natural and Artificial Sweeteners and High Fat Diet Modify Differential Taste Receptors, Insulin, and TLR4-Mediated Inflammatory Pathways in Adipose Tissues of Rats. *Nutrients*. 2019.;11(4):880.
95. Lizunkova P, Enuwosa E, Chichger H. Activation of the sweet taste receptor T1R3 by sucralose attenuates VEGF-induced vasculogenesis in a cell model of the retinal microvascular endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019.;257(1):71–81.
96. Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol Sci*. 2011.;122(1):1–6.
97. Mathur K, Agrawal RK, Nagpure S, Deshpande D. Effect of artificial sweeteners on insulin resistance among type-2 diabetes mellitus patients. *J Fam Med Prim Care*. 2020.;9(1):69–71.

98. Wiedemann SJ, Rachid L, Illigens B, Böni-Schnetzler M, Donath MY. Evidence for cephalic phase insulin release in humans: A systematic review and meta-analysis. *Appetite*. 2020.;155:104792.
99. Dummler BA, Hemmings BA. Protein Kinase B. U: Lennarz WJ, Lane MD, urednici. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [Internet]. New York: Elsevier; 2004 [Datum pristupa: 9. srpanja 2022.]. str. 516–22. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0124467109005463>
100. Agarwal AK. How to explain the AKT phosphorylation of downstream targets in the wake of recent findings. *Proc Natl Acad Sci*. 2018.;115(27):E6099–100.
101. Brami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, Pagès C, Hipskind RA, Caboche J. Dopamine Induces a PI3-Kinase-Independent Activation of Akt in Striatal Neurons: A New Route to cAMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation. *J Neurosci*. 2002.;22(20):8911–21.
102. Bychkov E, Ahmed MR, Dalby KN, Gurevich EV. Dopamine depletion and subsequent treatment with l-DOPA, but not the long-lived dopamine agonist pergolide, enhances activity of the Akt pathway in the rat striatum. *J Neurochem*. 2007.;102(3):699–711.
103. Belkacemi L, Zhong W, Darmani NA. Akt-PI3K signaling pathway is a crucial player in dopamine D2 receptor-mediated emesis in least shrews. *FASEB J*. 2020.;34(S1):1–1.
104. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Córdova GX, Gómez-Díaz RA, Almeda-Valdes P. Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2018.;108(3):485–91.
105. Gómez-Arauz AY, Bueno-Hernández N, Palomera LF, Alcántara-Suárez R, De León KL, Méndez-García LA, i ostali. A Single 48 mg Sucralose Sip Unbalances Monocyte Subpopulations and Stimulates Insulin Secretion in Healthy Young Adults. *J Immunol Res*. 2019.;2019:e6105059.
106. Ma Y xia, Wang X li, Chen J quan, Li B, Hur EM, Saijilafu. Differential Roles of Glycogen Synthase Kinase 3 Subtypes Alpha and Beta in Cortical Development. *Front Mol*

- Neurosci [Internet]. 2017. [Datum pristupa: 9. srpanja 2022.];10. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00391>
107. Jung EM, Ka M han, Kim WY. Loss of GSK-3 causes abnormal astrogenesis and behavior in mice. *Mol Neurobiol.* 2016.;53(6):3954–66.
108. GSK3A glycogen synthase kinase 3 alpha [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [Datum pristupa: 7. srpanja 2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2931>
109. Friedel RH, Wurst W, Wefers B, Kühn R. Generating Conditional Knockout Mice. U: Hofker MH, van Deursen J, urednici. *Transgenic Mouse Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [Datum pristupa: 7. srpanja 2022.]. str. 205–31. (Methods in Molecular Biology). Dostupno na: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-974-1_12
110. Evangelisti C, Chiarini F, Paganelli F, Marmioli S, Martelli AM. Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2020.;1867(4):118635.
111. Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul.* 2017.;65:5–15.
112. Mauger DM, Cabral BJ, Presnyak V, Su SV, Reid DW, Goodman B, i ostali. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc Natl Acad Sci.* 2019.;116(48):24075–83.
113. Silva GM, Vogel C. Quantifying gene expression: the importance of being subtle. *Mol Syst Biol.* 2016.;12(10):885.
114. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep.* 2015.;5(1):10775.

115. Mahmud R, Shehreen S, Shahriar S, Rahman MS, Akhteruzzaman S, Sajib AA. Non-Caloric Artificial Sweeteners Modulate the Expression of Key Metabolic Genes in the Omnipresent Gut Microbe *Escherichia coli*. *Microb Physiol*. 2019.;29(1–6):43–56.
116. Yu Z, Wang Y, Lu J, Bond PL, Guo J. Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through conjugative gene transfer. *ISME J*. 2021.;15(7):2117–30.
117. Greenhill C. Insulin and the insulin receptor regulate gene expression. *Nat Rev Endocrinol*. 2019.;15(6):315–315.
118. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014.;6(1):a009191.
119. Cai W, Sakaguchi M, Kleinridders A, Gonzalez-Del Pino G, Dreyfuss JM, O'Neill BT, i ostali. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun* [Internet]. 27. ožujak 2017. [Datum pristupa: 7. travanja 2022.];8. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378997/>
120. Chan S. Insulin Receptor. U: Enna SJ, Bylund DB, urednici. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* [Internet]. New York: Elsevier; 2007 [Datum pristupa: 3. srpnja 2022.]. str. 1–5. Dostupno na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323603605>
121. Bailyes EM, Navé BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J*. 1997.;327(1):209–15.
122. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, i ostali. Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells. *Mol Cell Biol*. 1999.;19(5):3278–88.
123. Hall C, Yu H, Choi E. Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Exp Mol Med*. 2020.;52(6):911–20.

124. Sehat B, Andersson S, Vasilcanu R, Girnita L, Larsson O. Role of Ubiquitination in IGF-1 Receptor Signaling and Degradation. *PLoS ONE*. 2007.;2(4):e340.
125. de la Cruz López KG, Toledo Guzmán ME, Sánchez EO, García Carrancá A. mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2019. [Datum pristupa: 10. srpanja 2022.];9. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01373>
126. Kung CP, Weber JD. It's Getting Complicated—A Fresh Look at p53-MDM2-ARF Triangle in Tumorigenesis and Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022. [Datum pristupa: 10. srpanja 2022.];10. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.818744>
127. Ecker V, Stumpf M, Brandmeier L, Neumayer T, Pfeuffer L, Engleitner T, i ostali. Targeted PI3K/AKT-hyperactivation induces cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*. 2021.;12(1):3526.

11. Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime: Marina Čović

Datum rođenja: 19. listopada 1996.

Mjesto rođenja: Vinkovci, Republika Hrvatska

Mjesto stanovanja: Osijek, 31000

Obrazovanje

2015. - 2022. Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek

2011. - 2015. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci