

# Izražaj paneksina 1 tijekom razvoja bubrega i prognostički značaj u dijabetičkoj nefropatiji

---

Jeličić, Ivo

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:604482>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVO JELIČIĆ**

**IZRAŽAJ PANEKSA 1 TIJEKOM RAZVOJA BUBREGA I  
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ U DIJABETIČKOJ NEFROPATIJU**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVO JELIČIĆ**

**IZRAŽAJ PANEKSA 1 TIJEKOM RAZVOJA BUBREGA I  
PROGNOSTIČKI ZNAČAJ U DIJABETIČKOJ NEFROPATIJU**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2023.**

Doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

## Zahvala

*„Najbolji pogled dolazi nakon najtežeg uspona!“ – nepoznati autor.*

*A kada bi bilo teško i ne možeš dalje ...*

*... našao bi se netko u mnoštvu dragih ljudi koji su mi pomogli napraviti sljedeći korak.*

*Želim se zahvaliti svim tim brižnim i pouzdanim ljudima koji su bili uz mene na ovoj nezaboravnoj avanturi.*

*Prvenstveno svojoj obitelji koji su bili uz mene svakim korakom ovog puta, te mi svojom ljubavi, čvrstom vjerom, razumijevanjem i podrškom pomogli da idem naprijed.*

*Prof.dr.sc. Nataliji Filipović na njenom vremenu (a često vikendima i blagdanima), mentorstvu, stručnom vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije.*

*Prof.dr.sc. Draganu Ljutiću, prvom mentoru i istinskom učitelju koji me kroz kliničko iskustvo uveo i u znanstvene vode te posebno na nesebičnom prenošenju znanja i iskustva.*

*I za kraj bih se složio s Paulom Coelho...*

*„Ako mislite da je avantura opasna, pokušajte s rutinom: smrtonosna je.“*

## POPIS OZNAKA I KRATICA

|       |   |
|-------|---|
| ACE   | angiotenzin-konvertirajući enzim  |
| ADH   | antidiuretski hormon  |
| AGEs  | krajnji produkti uznapredovale glikacije (engl. <i>advanced glycation end products</i> )            |
| AOB   | akutno oštećenja bubrega  |
| AQP   | akvaporin   |
| ATP   | adenozin trifosfat  |
| aSMA  | engl. <i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>  |
| DAMP  | molekularni obrazac povezan s oštećenjem tkiva (engl. <i>damage-associated molecular patterns</i> ) |
| DAPI  | 4'6'-diamidino-2-fenilindol   |
| DBA   | <i>Dolichos Biflorus</i> aglutinin  |
| DN    | dijabetička nefropatija   |
| GBM   | glomerularna bazalna membrana   |
| GF    | glomerularna filtracija   |
| IFTA  | intersticijska fibroza i tubularna atrofija   |
| IL    | interleukin   |
| KBB   | kronična bubrežna bolest  |
| LTL   | <i>Lotus Tetragonolobus</i> lektin  |
| MET   | Mezenhimsko-epitelna transformacija (engl. <i>mesenchymal-to-epithelial transition</i> )            |
| NF-κB | nuklearni faktor-κB   |
| NO    | dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )  |
| OAK   | omjer albumin-kreatinin   |
| Panx1 | paneksin 1  |
| PBS   | fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )                    |
| PKC   | protein kinaza C  |
| PRP   | receptor za prepoznavanje uzorka (engl. <i>pattern recognition receptor</i> )                       |
| RAAS  | renin-angiotenzin-aldosteron sustav   |
| ROS   | reaktivni kisikovi oblici (engl. <i>reactive oxygen species</i> )                                   |
| SGLT2 | natrij-glukoza ko-transporter 2 (engl. <i>sodium-glucose co-transporter-2</i> )                     |
| TGF-β | transformacijski faktor rasta-β (engl. <i>transforming growth factor-β</i> )                        |

TNF- $\alpha$  faktor nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* )  
VEGF faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1. BUBREG .....  | 2  |
| 1.1.1. Anatomija bubrega.....  | 2  |
| 1.1.2. Funkcija bubrega.....   | 6  |
| 1.1.3. Razvoj bubrega .....  | 8  |
| 1.1.4. Kronična bubrežna bolest .....  | 10 |
| 1.2. DIJABETIČKA NEFROPATIJA .....   | 12 |
| 1.2.1. Patofiziologija dijabetičke nefropatije .....   | 13 |
| 1.2.2. Dijagnoza dijabetičke nefropatije .....   | 15 |
| 1.2.3. Prognoza dijabetičke nefropatije.....   | 17 |
| 1.2.4. Liječenje dijabetičke nefropatije.....  | 17 |
| 1.3. PANEKSINI .....   | 17 |
| 1.3.1. Struktura i funkcija .....  | 18 |
| 1.3.2. Paneksin 1 i bubreg.....  | 21 |
| 2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....   | 23 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....  | 25 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....   | 27 |
| 4.1. Nabava i obrada tkiva .....   | 28 |
| 4.2. Imunohistokemijski postupak .....   | 28 |
| 4.3. Prikupljanje i analiza podataka .....   | 31 |
| 4.4. Statistička analiza.....  | 31 |
| 5. REZULTATI.....  | 33 |
| 5.1. Bubrežna ekspresija panx1 u ljudskom bubregu tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja. ....  | 34 |
| 5.1.1. Šesti do sedmi tjedan razvoja.....  | 34 |
| 5.1.2. Osmi do deseti tjedan razvoja .....   | 36 |
| 5.1.3. <i>Lotus tetragonolobus</i> lektin - vezanje tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja i njegova kolokalizacija s ekspresijom panx1 ..... | 38 |
| 5.2. Bubrežna ekspresija panx1 u postnatalnom ljudskom bubregu .....   | 40 |
| 5.3. Ekspresija panx1 u dijabetičkim i nedijabetičkim uzorcima bubrega .....   | 45 |
| 6. RASPRAVA .....  | 48 |
| 7. ZAKLJUČCI.....  | 54 |
| 8. LITERATURA .....  | 56 |
| 9. SAŽETAK .....   | 63 |



|                     |    |
|---------------------|----|
| 10. SUMMARY .....   | 65 |
| 11. ŽIVOTOPIS ..... | 67 |

## **1. UVOD**

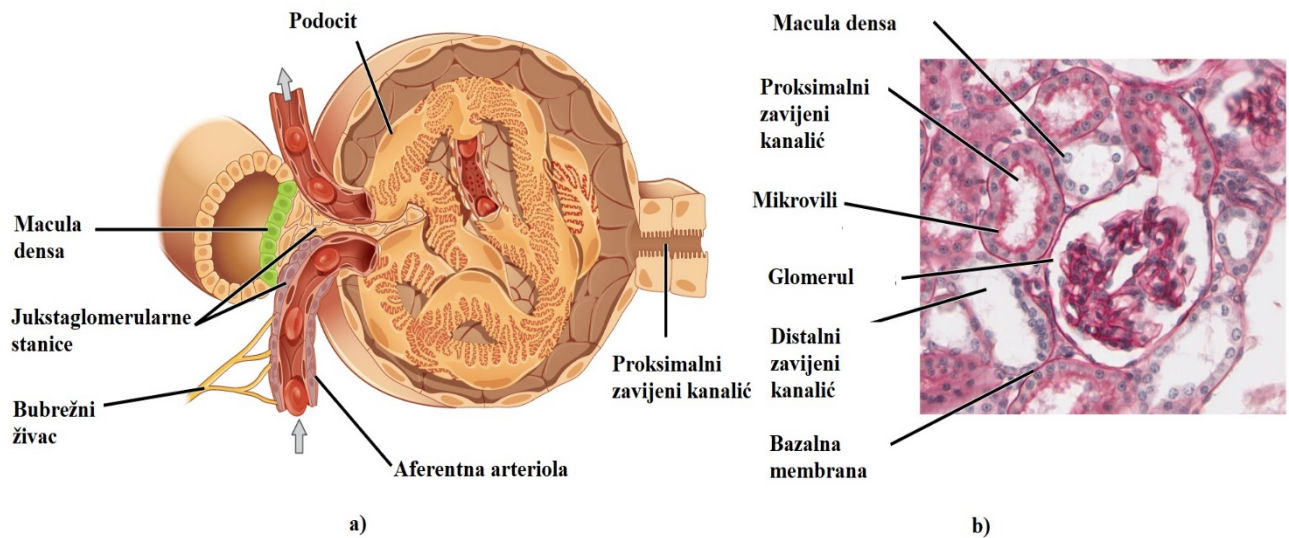
## 1.1. BUBREG

### 1.1.1. Anatomija bubrega

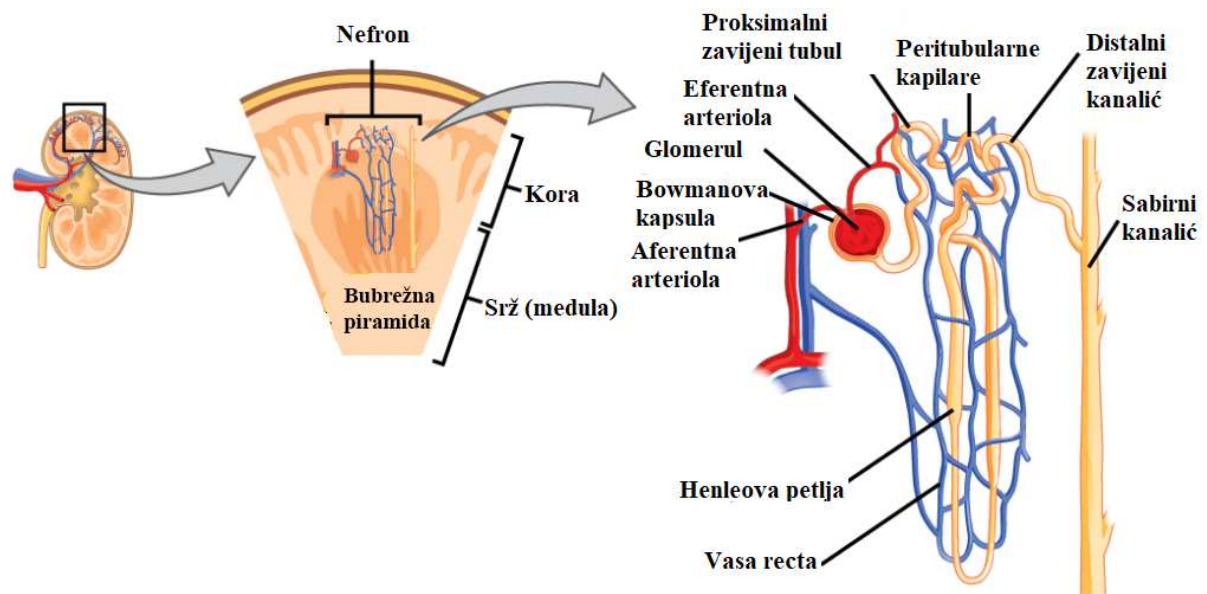
Mokraćni sustav čovjeka sastoji se od bubrega, uretera, mokraćnog mjehura i uretre. Bubrezi su parenhimski parni organ, najvažniji i najsloženiji dio mokraćnog sustava. Prosječne dužine 10-12 cm, najčešće opisivan da je oblika graha, izvana je obložen bubrežnom fascijom i čahurom, a parenhim se sastoji od kore (korteksa) i srži (medule) bubrega. Medulu čini 8 do 15 struktura koje se nazivaju bubrežne piramide, a sadrže Henleove petlje nefrona te sabirne kanaliće. Vrhovi piramida ili bubrežne papile mjesto su gdje se mokraća formirana unutar piramida prazni u male bubrežne čašice ili vrčeve, koje se dalje spajaju u velike bubrežne vrčeve i konačno u bubrežnu nakapnicu, odakle se ureterima mokraća odvodi do mokraćnog mjehura. Kora bubrega, osim vanjskog dijela, zauzima i dio između bubrežnih piramida tvoreći bubrežne ili Bertinijeve stupce, a sadrži bubrežna tjelešca i zavijene kanaliće nefrona. Oko 15% nefrona smješteno je blizu kortikomedularne granice i nazivaju se jukstamedularni nefroni (1).

Svaki bubreg se sastoji od oko milijun nefrona koji su glavna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega. **Nefron** je vrlo složena struktura koja se sastoji od dva glavna dijela: bubrežnog (Malpighijevog) tjelešca i tubula, a svako bubrežno tjelešce je građeno od glomerula i Bowmanove čahure. Bubrežno tjelešce ima vaskularni pol - mjesto gdje ulazi dovodna ( aferentna) arteriola i izlazi odvodna ( eferentna) arteriola; i urinarni ili tubularni pol – mjesto gdje počinje proksimalni zavijeni kanalić tj. tubularni dio nefrona. Glomerul je klupko specijaliziranih polupropusnih kapilara kroz koje se filtrira krv i ukupno čine oko 19 km kapilarne filtracijske površine (Slika 1) (2). Bowmanova čahura je zapravo proširenje proksimalnog kanalića koje obavija glomerul i sastoji se od dva epitelna sloja koja tvore postfiltracijsku barijeru tj. Bowmanov ili urinarni prostor. Vanjski ili parijetalni sloj izgrađen je od jednoslojnog pločastog epitela i retikulinskih vlakana dok unutarnji ili visceralni sloj koji obavija kapilare glomerula, ima važnu ulogu u filtraciji i izgrađen je od specijaliziranih stanica podocita. Podociti su građeni od trupa stanice i brojnih izdanaka citoplazme (nožica) koji obavijaju kapilare glomerula i s njima čine glomerularnu filtracijsku membranu. Intraglomerularne mezangijske stanice zajedno s ekstracelularnim matriksom čine mezangij koji održava glomerularnu strukturu. Tubularni dio nefrona sastoji se od proksimalnog zavijenog kanalića na koji se nastavlja Henleova petlja i potom distalni zavijeni kanalić koji je završni dio nefrona, a nastavlja se u sabirne kanaliće (Slika 2). Oskudni dio bubrežnog

parenhima koji nije popunjen kanalićima građen je od intersticijskih stanica, vezivnog tkiva i fibroblasta te se naziva intersticij bubrega (1-3).

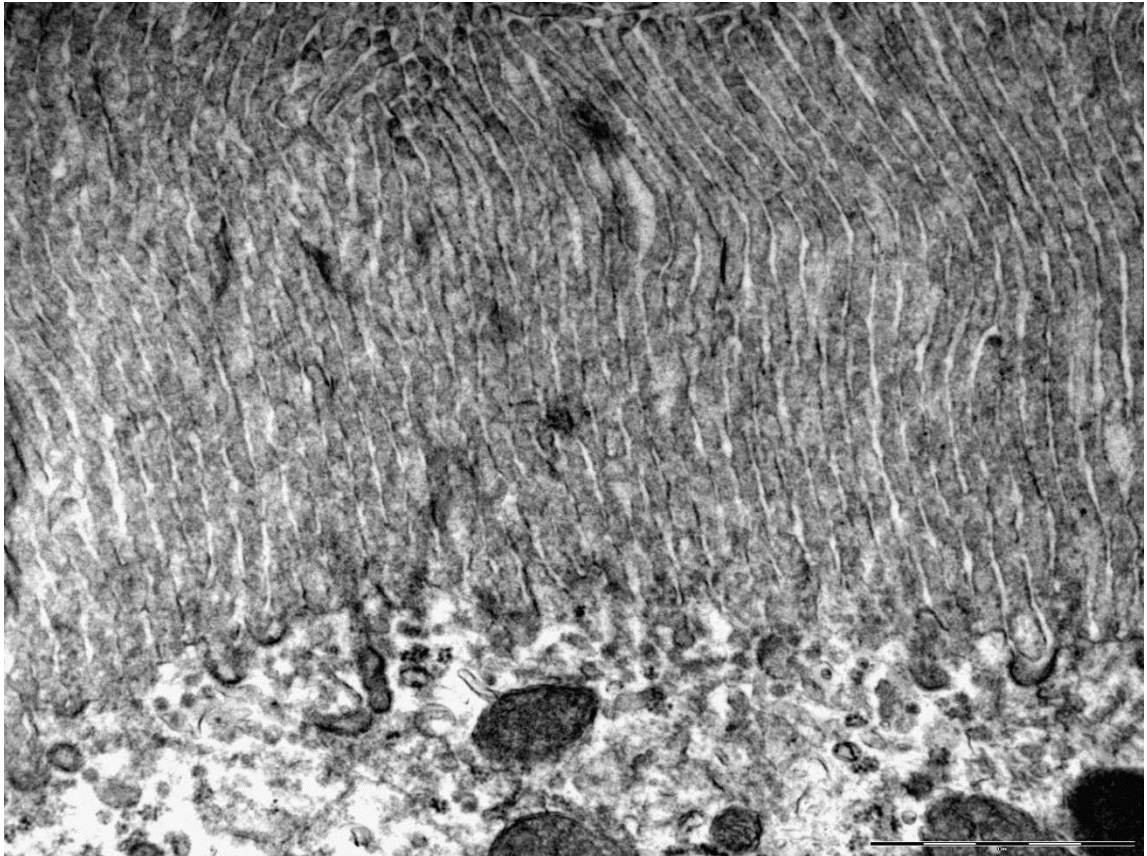


**Slika 1.** a) Glomerularna kapsula, b) Glomerul (Svjetlosni mikroskop, povećanje 1540x). Preuzeto i prilagođeno (1). Slobodan pristup na: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>



**Slika 2.** Funkcionalna jedinica bubrega - nefron. Glomerul i zavijeni kanalići se nalaze u korteksu bubrega, dok su Henleova petlja i sabirni kanalići smješteni u piramidama medule. Preuzeto i prilagođeno (1). Slobodan pristup na: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>

**Proksimalni zavijeni kanalić** građen je jednog sloja kubičnih ili niskih cilindričnih visokopropusnih epitelnih stanica s brojnim mikrovilima na luminalnoj površini (Slika 3). Ti mikrovili povećavaju površinu kako bi se povećala apsorpcija i sekrecija otopljenih tvari, što je i najvažnija funkcija ovog dijela nefrona. Ove stanice aktivno prenose ione kroz svoje membrane putem brojnih Na/K-ATP-aznih crpki, tako da posjeduju veliki broj mitohondrija kako bi proizvele dovoljno adenozin tri fosfata (ATP) (1).



**Slika 3.** Detalj četkaste prevlake u proksimalnom zavijenom kanaliću zdravog bubrega štakora. Ljubaznošću prof. dr. sc. Ivane Bočine i izv. prof. dr. sc. Natalije Filipović.

**Henleova petlja** se nastavlja na proksimalni zavijeni kanalić, ima oblik slova U i sastoji se od četiri dijela: debeli dio silaznog kraka, tanki silazni dio, tanki uzlazni dio te debeli uzlazni krak. Silazni krak vrlo je propustan za vodu i potpuno nepropustan za ione, što uzrokuje reapsorpciju velike količine vode u hipertonični medularni intersticij i povećanje osmolarnosti filtrata na maksimalno oko 1200 mOsm/L. Nasuprot tome, uzlazni krak Henleove petlje je nepropustan za vodu, ali vrlo propustan za ione, što uzrokuje pasivnu reapsorpciju natrija i veliki pad osmolarnosti filtrata koji prolazi kroz petlju. U tom dijelu nefrona reapsorbira se 40%

natrija i 30% filtrirane vode. Jukstamedularni nefroni za razliku od kortikalnih imaju duže segmente Henleove petlje i značajniju funkciju u koncentriranju urina (2).

**Distalni zavijeni kanalić** nastavlja se na uzlazni krak Henleove petlje i građen je od jednoslojnog kubičnog epitela koji u usporedbi s proksimalnim kanalićem nema mikrovile i nije toliko aktivan. Za razliku od ostalih dijelova nefrona, njegova propusnost za vodu ovisi o hormonskom podražaju (aldosteron i antidiuretski hormon), te se na taj način omogućava složena regulacija osmolarnosti krvi, volumena plazme, arterijskog tlaka i acidobazne ravnoteže. Stanice distalnog tubula također koriste aktivni transport protiv koncentracijskog gradijenta, zbog čega koriste velike količine ATP-a. Na mjestu gdje je distalni zavijeni kanalić prolazi kraj vaskularnog pola, dolazi u bliski kontakt s aferentnom arteriolom i tvori *maculu densu* – promijenjene stanice distalnog kanalića osjetljive na volumen vode i ionski sadržaj mokraće. Specijalizirane glatke stanice aferentne arteriole na tom mjestu nazivaju se **jukstaglomerularne stanice** te imaju sposobnost sekrecije enzima nazvanog renin koji je sudjeluje u reguliranju arterijskog tlaka. Renin djeluje na angiotenzinogen pri čemu nastaje angiotenzin I koji uz pomoć angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) u plućima stvara angiotenzin II. Angiotenzin II ima snažno vazokonstriktorno djelovanje te potiče lučenje aldosterona – hormona koji djeluje na stanice distalnog tubula i sabirnog kanalića potičući reapsorpciju natrija i vode (1, 3, 4).

**Sabirni kanalići** su nastavak distalnog kanalića ali oni se ne smatraju dijelom nefrona. Svaki sabirni kanalić skuplja filtrat iz nekoliko nefrona za konačnu modifikaciju. Njihov pločasti epitel je osjetljiv na djelovanje antidiuretskog hormona (ADH), pod čijim utjecajem dolazi do umetanja akvaporinskih kanala u njegovu membranu i reapsorpcije vode. Sabirni kanalići se spajaju kako se spuštaju dublje u medulu i formiraju oko 30 završnih kanalića, koji se prazne u papilu (1).

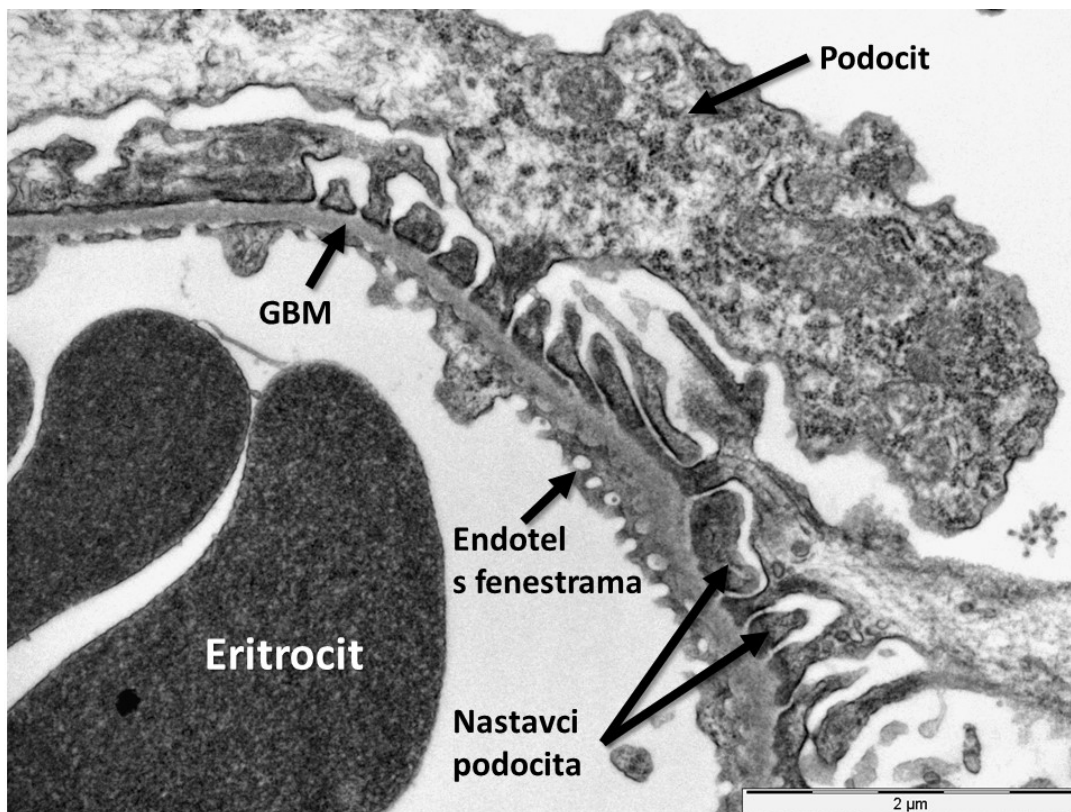
**Bubrežna cirkulacija** odvija se putem renalne arterije koja se u području hilusa dijeli u 3-5 grana te potom dalje u interlobarne arterije koje prolaze kroz Bertinijeve kolumne do baza piramida gdje se potom dijele u lučne arterije koje su paralelne s površinom bubrega. Iz njih se dalje granaju interlobularne arterije, a njihovim sekvencijskim dijeljenjem nastaju aferentne arteriole. Nakon prolaska kroz bubrežno tjelešće, kapilare tvore odvodnu (eferentnu) arteriolu. One zatim formiraju kapilarnu mrežu oko proksimalnih i distalnih kanalića (peritubularne kapilare) i duge ravne arteriole i venule (lat. *vasa recta*) koje se nastavljaju u srž uz krakove Henleove petlje (Slika 2). Peritubularne kapilare omogućuju reapsorpciju i sekreciju između krvi i tubula. Spajajući se tvore bubrežne vene koje vraćaju filtriranu krv s manje otpadnih tvari

u venski sustav. Vene kroz koje krv napušta bubreg imaju isti tok kao i arterije (lučne vene, interlobarne vene, bubrežna vena) (2, 3).

### 1.1.2. Funkcija bubrega

Bubrezi su zaduženi su za održavanje homeostaze tekućine i elektrolita u organizmu. Primarnim funkcijama kao što su filtracija, reapsorpcija i sekrecija uspostavljaju ravnotežu elektrolita koji proizlaze iz raznih fizioloških i patoloških metaboličkih procesa. Tim procesima se oko 120 ml/min glomerularnog filtrata pretvara u oko 1 ml/min urina (2).

Primarna funkcija glomerula je filtracija koja je prvi korak u formiranju urina. **Glomerularna filtracija (GF)** označava ukupnu količinu krvi koja je profiltrirana kroz sve glomerule u jedinici vremena (ml/min). Glomerularna filtracijska membrana složena je, integrirana, višeslojna struktura koja se sastoji od fenestriranog endotela kapilara, glomerularne bazalne membrane (GBM) i fenestrirane dijafragme građene od nastavaka podocita (Slika 4.). Filtriranje ovisi o veličini, naboju, obliku i topivosti čestica. Prosječna veličina pora je 8 nm te stoga samo čestice manje veličine prolaze kroz njih (1). Glomerularna bazalna membrana nosi negativan naboj, čime se sprječava prolazak negativno nabijenih čestica. Sve navedeno rezultira svojstvima filtracijske membrane da je slabo propusna za velike, u lipidima netopive i anionske molekule dok je visoko propusna za vodu i male molekule topljive u vodi. Osim o filtracijskom koeficijentu propusnost GF također ovisi o gradijentu hidrostatskog tlaka i koloidno osmotskim tlakovima (2). Dnevno se na taj način filtrira oko 180 litara tekućine. U slučaju kroničnih bolesti (npr. šećerna bolest ili hipertenzija) može doći do zadebljana GBM a time i do smanjenja filtracijskog koeficijenta i GF. Bolesti koje dovode do smanjenja koloidno-osmotskog tlaka u kapilarama (npr. smanjena sinteza albumina zbog jetrenih bolesti) također dovode do smanjenja GF. Hidrostatski tlak u glomerularnim kapilarama ovisi o arterijskom tlaku te otporu aferentne i eferentne arteriole (4). Glomerularnu filtraciju je moguće procijeniti mjerenjem određenih parametara kao što su koncentracija ureje i kreatinina u krvi i urinu, volumen urina, dob, spol i tjelesna težina te na temelju nje možemo zaključiti kakva je bubrežna funkcija (5).



**Slika 4.** Detalj glomerularne filtracijske membrane zdravog bubrega štakora prikazan elektronskim mikroskopom. Ljubaznošću prof. dr. sc. Ivane Bočine i izv. prof. dr. sc. Natalije Filipović.

Tubularni sustav odgovoran je za reapsorpciju većine vode, elektrolita, hranjivih tvari kao i za izlučivanje nekih tvari koje još nisu filtrirane. Mehanizmi kojima se tvari kreću kroz membrane stanica uključuju aktivni transport, difuziju, olakšanu difuziju, sekundarni aktivni transport i osmozu. Različiti dijelovi nefrona razlikuju se po svojoj sposobnosti reapsorpcije vode i specifičnih otopljenih tvari. Dok se veliki dio reapsorpcije i izlučivanja odvija pasivno na temelju koncentracijskog gradijenta, količina vode koja se reapsorbira ili gubi strogo je regulirana ADH-om i aldosteronom. Većina vode se reapsorbira u proksimalnom kanaliću, Henleovoj petlji i distalnom kanaliću. Oko 10% filtrata (oko 18 litara) dopijeva u sabirne kanale gdje se pod utjecajem ADH u određenim situacijama (npr. dehidracija) može reapsorbirati gotovo sva voda (1).

Osim ekskrecijske funkcije (regulacija vode i elektrolita, uklanjanje štetnih tvari iz organizma) bubrezi također imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma minerala u kostima, regulaciji arterijskog tlaka, eritropoezi, glukoneogenezi i regulaciji acidobazne ravnoteže.

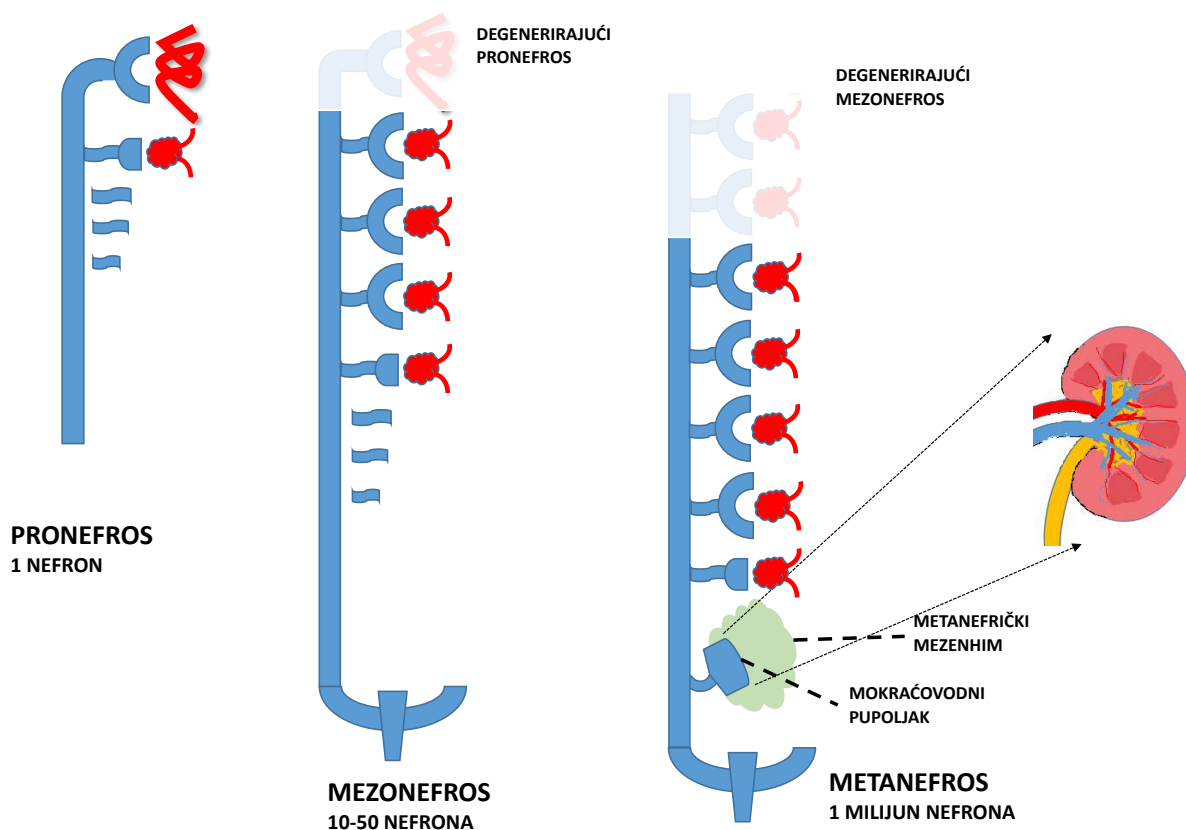


Eritropoetin je protein od 193 aminokiseline koji je esencijalni hormon za stimuliranje eritropoeze tj. stvaranje crvenih krvnih stanica u koštanoj srži. Osamdeset pet posto eritropoetina proizvode intersticijski peritubularni fibroblasti bubrega kao odgovor na staničnu hipoksiju. Također ga u manjoj količini sintetiziraju i perisinusoidne stanice u jetri ali većinom u fetalnom i perinatalnom razdoblju (6). Bubrezi također obavljaju završni korak sinteze vitamina D, hidroksilacijom pretvaraju kalcidiol u kalcitriol, aktivni oblik vitamina D. Također, pomažu regulirati arterijski tlak lučenjem renina koji je dio sustava renin-angiotenzin-aldosteron ali i kontrolom gubitka natrija i vode čime se regulira osmolarnost krvi. Bubrezi za vrijeme dugotrajnog gladovanja sintetiziraju glukozu iz aminokiselina, procesom glukoneogeneze (1).

### 1.1.3. Razvoj bubrega

Složeni razvoj bubrega kod čovjeka uključuje tri skupine uzastopnih struktura: pronefros (predbubreg), mezonefros (prabubreg) i metanefros (definitivni bubreg). Pronefros i mezonefros su prolazne strukture čija regresija dopušta metanefrosu da se diferencira u definitivni, funkcionalni bubreg (Slika 5) (7). Zanimljivo je da su te prolazne strukture neophodne za razvoj konačnog bubrega, budući da prekid njihovog razvoja dovodi do ageneze bubrega (8). **Pronefros** se pojavljuje oko 20-22. dana trudnoće u kranijalnom području srednjeg mezoderma. Sastoji se od 6-10 nakupina stanica od kojih nastaju rudimentarni kanalići (nefrotomi) koji se spajaju bočno s pronefričkim kanalom. Do kraja četvrtog tjedna pronefros u potpunosti degenerira. Kako se izdužuje kaudalno, pronefrički kanal inducira obližnji intermedijarni mezoderm u torakolumbalnom području iz kojeg se razvija **mezonefros**. Počinje se razvijati u 4. tjednu i degenerira prema kraju 12. tjedna. Tijekom razvoja mezonefrosa nastaju sekretorni kanalići koji se razvijaju u petlju u obliku slova S, u njih urasta klupko kapilara te tako dolazi do razvoja prvih primitivnih nefrona. Svaki nefron je kanalićem povezan s nastavkom pronefričkog kanala koji se sada naziva kanal mezonefrosa ili Wolffov kanal i ulijeva se u kloaku. Jednostavni mezonefrički nefroni prve su funkcionalne jedinice i proizvode male količine urina između 6. i 10. tjedna trudnoće, koji se luči u amnionsku tekućinu. Na vrhuncu mezonefričkog razvoja prisutno je oko 40 primitivnih nefrona. Potkraj drugog mjeseca dok se donji kanalići još diferenciraju, gornji razvijeni kanalići iščezavaju. Kanal mezonefrosa kod žena propada između 8. i 16. tjedna, dok kod muškaraca sudjeluje u razvoju spolnih organa (3).

Tijekom petog tjedna gestacije, kanal mezonefrosa u kaudalnom dijelu inducira zgušnjavanje intermedijarnog mezoderma te nastanak metanefrogenog tkiva (blastema). U blizini pripoja kanala mezonefrosa na kloaku metanefrogeni blastem inducira razvoj mokraćovodnog pupoljaka. Primordija trajnog bubrega, metanefros, počinje se razvijati u petom tjednu iz metanefrogenog mezoderma. Mokraćovodni pupoljak prodire u metanefrogeno tkivo koje ga prekriva poput kape. Signali otpušteni iz mokraćovodnog pupoljka potiču diferencijaciju metanefrogenog blastema u glomerule i bubrežne tubule, a širenjem distalnog dijela razvija se odvodni sustav bubrega (mokraćovod, nakapnica, veliki i mali vrčevi te oko 1-3 milijuna sabirnih kanalića) (9). Razvoj nefrona započinje zgušnjavanjem metanefrogenog tkiva u kapu metanefrogenog tkiva. Zbog indukcijskog djelovanja vrhova sabirnih kanalića na zgusnuće metanefrogenog tkiva (nastanak kape metanefrogenog tkiva) stvara se bubrežni mjehurić. Stvaranje bubrežnog mjehurića je završni korak mezenhimsko-epitelne transformacije. Bubrežni mjehurić se izdužuje u kanaliće koji imaju oblik slova S. Proksimalni kraj S-oblika čini Bowmanovu čahuru, a distalni kraj se povezuje sa sabirnim kanalićima. Izduživanjem distalnog kraja kanalića nastaju proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja, te distalni zavijeni kanalić. Prvi glomeruli metanefrosa pojavljuju se u ljudi nakon devet tjedana, a nefrogeneza je gotova do 36. tjedna trudnoće (10). Međutim, te strukture još nisu zrele i nastavit će sazrijevati nakon rođenja ali bez povećanja broja nefrona. Nakon što sazriju, procjenjuje se da ima oko milijun nefrona po bubregu, ali taj broj je vrlo varijabilan i kreće se od približno 200.000 do više od 2,5 milijuna po bubregu (7). Mezenhimsko-epitelna transformacija (engl. *mesenchymal-to-epithelial transition*; MET) (11) i obrnuti proces prijelaza epitela u mezenhim (engl. *epithelial-to-mesenchymal transition*) (12) igraju ključnu ulogu u nefrogenezi, posebno u razvoju podocita. Recipročna indukcija odgovorna je za inicijaciju i regulaciju MET-e, u kojoj mokraćovodni pupoljak i metanefrogeni blastem induciraju jedan drugoga (10). Molekularne studije su pokazale da navedene procese regulira složena interakcija različitih signalnih sustava, uključujući GDNF (engl. *Glial-Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor*), Wnt (engl. *Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site*) i BMP (engl. *Bone morphogenetic protein*) signalne putove. Sve više dokaza ukazuje na ulogu međustanične komunikacije putem tijesnih spojeva (engl. *gap junction*) i koneksinskih hemikanala u razvoju bubrega (13). Nedavno je opisana ekspresija različitih tipova koneksina u ljudskom bubregu tijekom embrionalnog/ranog fetalnog razvoja (14, 15). Međutim, nema podataka o ekspresiji i ulozi paneksina 1 (Pax1) u embrionalnom i fetalnom razvoju bubrega općenito, a posebno u ljudskom embriju.



**Slika 5.** Razvoj bubrega. Shematski prikaz tri generacije bubrega: pronefros, mezonefros i metanefros. Izradio autor.

#### 1.1.4. Kronična bubrežna bolest

Kronična bubrežna bolest (KBB), koja se naziva i kronično zatajenje bubrega, uključuje postupni gubitak funkcije bubrega. Proizlazi iz raznih patofizioloških putova brojnih bolesti koji nepovratno mijenjaju funkciju i strukturu bubrega tijekom mjeseci ili godina. Dijagnoza KBB se temelji se na utvrđivanju kroničnog smanjenja funkcije bubrega i strukturnog oštećenja bubrega. Kronična bubrežna bolest definira se kao poremećaj strukture ili funkcije bubrega koji traje dulje od tri mjeseca s utjecajem na zdravlje (16). Kriteriji za dijagnozu KBB su ispunjeni ukoliko je prisutno slijedeće:  $GF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  ili znakovi oštećenja bubrega (albuminurija  $> 30 \text{ mg/24h}$ , patološki nalaz sedimenta mokraće, poremećaj elektrolita ili drugih biokemijskih pretraga krvi zbog tubularnih poremećaja, poremećaji otkriveni histološkim

pregledom, strukturni poremećaji otkriveni slikovnom dijagnostikom, te prethodna transplantacija bubrega) (16).

Kronična bubrežna bolest se klasificira na temelju kategorije GF i kategorije albuminurije (16).

Na osnovi procijenjene GF razlikuje se pet kategorija KBB:

**G1** - GF > 90 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,

**G2** - bolesnici s GF 60-89 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,

**G3a** - bolesnici s GF 45-59 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,

**G3b** - bolesnici s GF 30-44 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,

**G4** - bolesnici s GF 15-29 ml/min/1,73m<sup>2</sup>,

**G5** - bolesnici s GF < 15 ml/min/1,73m<sup>2</sup> ili su već na dijalizi.

Albuminurija je podijeljena tri kategorije s obzirom na vrijednosti u 24h urinu ili omjeru albumina i kreatinina u urinu (OAK):

**A1** - <30 mg/dan ili OAK < 3 mg/mmol (<30 mg/g);

**A2** - 30-300 mg/dan; OAK 3-30 mg/mmol (30-300 mg/g);

**A3** - >300 mg/dan; OAK >30 mg/mmol (>300 mg/g);

Kronična bubrežna bolest sve je veći zdravstveni problem. Na temelju velikih epidemioloških ispitivanja pretpostavlja se da približno 10% odrasle svjetske populacije ima neki oblik KBB. Osim što je visoko prevalentna KBB je neovisni čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti, hospitalizaciju i smrtnost od svih uzroka te rezultira s oko 1,2 milijuna smrti godišnje (17). Procjenjuje se da će do 2040. god. KBB postati peti vodeći uzrok smrti u svijetu što je jedan od najvećih projiciranih porasta glavnih uzroka smrti (18).

Šećerna bolest i arterijska hipertenzija glavni su uzročnici KBB u svim zemljama s visokim i srednjim dohotkom, kao i u mnogim zemljama s niskim dohotkom (19). Prema podacima Hrvatskog registra za nadomještanje bubrežne funkcije u Hrvatskoj godišnje oko šest stotina novih bolesnika započinje s dijalizom, a najčešći uzroci zatajenja bubrega bili su dijabetička nefropatija (DN) (28%), hipertenzija (25%), glomerulonefritisi (12%) i policistična bolest bubrega (6%) (20).

Jedan od glavnih uzroka KBB je DN koja uzrokuje 30–50% svih KBB i pogađa oko 285 milijuna (6,4%) odraslih osoba diljem svijeta, te se očekuje povećanje za gotovo 70% u zemljama s visokim dohotkom i 20% u zemljama s niskim i srednjim dohotkom do 2030. godine (19).

Završna patološka manifestacija mnogih KBB je fibroza bubrega. Bubrežna fibroza posljedica je neuspješnog cijeljenja bubrežnog tkiva nakon kronične, dugotrajne ozljede, a karakterizirana je glomerulosklerozom, tubularnom atrofijom i intersticijskom fibrozom (19). Glomeruloskleroza je potaknuta oštećenjem i disfunkcijom endotela, proliferacijom glatkih mišićnih stanica i mezangijskih stanica te oštećenjem podocita koji oblažu GBM. Čimbenici rizika za progresivnu glomerulosklerozu uključuju arterijsku hipertenziju, dislipidemiju i pušenje. Tubularna atrofija i intersticijska fibroza usko su povezani s GF i proteinurijom. Proteini u mokraći (npr. albumini, komplement, citokini) potiču tubularne epitelne stanice da sintetiziraju upalne produkte koji uključuju kisikove radikale (engl. *reactive oxygen spesies* - ROS) i kemokine. Ovi agensi privlače upalne stanice u bubrežni intersticij i pokreću interakcije s intersticijskim miofibroblastima. Kako se fibroza razvija, oštećeni tubularni epitel gubi sposobnost regeneracije i prolazi kroz apoptozu, što dovodi do tubularne atrofije i stvaranja nefunkcionalnih glomerula (19).

Bolesnici u početnim stadijima KBB najčešće su asimptomatski, a klinički znakovi uremijskog sindroma tipično se javljaju tek u uznapredovanom stupnju KBB. Kako se GF smanjuje simptomi vezani uz endokrino/metaboličke poremećaje (manjak eritropoetina i vitamina D) ili neadekvatnu ekskretornu funkciju (poremećaj ravnoteže vode i elektrolita) postaju klinički očigledni.

Liječenje KBB temelji se na usporavanju napredovanja bolesti, smanjenju dodatnog oštećenja i liječenju komplikacija zbog čega je iznimno važno rano otkrivanje. Nekoliko je najvažnijih stavki u prevenciji progresije KBB: kontrola arterijskog tlaka ( $< 130/80$  mmHg), kontrola glikemije u bolesnika sa šećernom bolesti, korištenje renoprotektivnih lijekova (blokatori sustava renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS), SGLT2 inhibitori, statini), kontrola proteinurije, smanjeni unos soli ( $< 2$  g/dan) i proteina ( $< 0.8$  g/kg/dan), te korekcija metaboličke acidoze (17). Kada dođe do završnog stupnja kroničnog bubrežnog zatajenja i pojave simptoma uremije neophodno je nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom ili transplantacijom.

## **1.2. DIJABETIČKA NEFROPATIJA**

Dijabetička nefropatija je klinički sindrom karakteriziran dugotrajnom albuminurijom, arterijskom hipertenzijom i progresivnim padom bubrežne funkcije, a odnosi se na specifične

patološke, strukturne i funkcionalne promjene koje se vide u bubrežima pacijenata sa šećernom bolesti tipa 1 i tipa 2, a koje su rezultat učinka šećerne bolesti na bubrege (21, 22).

Zabilježeno je da se DN pojavljuje u 20% do 50% bolesnika sa šećernom bolesti i najčešći je pojedinačni uzrok završnog stupnja KBB u mnogim populacijama (21, 23).

### 1.2.1. Patofiziologija dijabetičke nefropatije

Patogeneza razvoja i progresije DN je složena i multifaktorijalna s uključenošću mnogih patofizioloških putova i medijatora (21). Metabolički procesi kao što su oksidativni stres, stvaranje krajnjih produkata uznapredovale glikacije (engl. *advanced glycation end products*; AGEs), procesi stanične signalizacije i obnove, fibroza i epigenetika ključni su aspekti patofiziologije DN i potencijalni ciljevi za buduću terapiju lijekovima (24).

Patofiziološki, za razvoj DN važan je dijabetički milje koji dovodi do stvaranja i cirkulacije AGEs, izlaganje čimbenicima rasta te raznih hemodinamskih i hormonalnih promjena. To dovodi do oslobađanja ROS i upalnih medijatora. Te promjene rezultiraju glomerularnom hiperfiltracijom, glomerularnom hipertenzijom i bubrežnom hipertrofijom, što se klinički očituje kao albuminurija i hipertenzija (22).

Hiperglikemija ima centralnu ulogu u patogenezi DN. Ona uzrokuje promjenu metabolizma glukoze, što dovodi do povećane proizvodnje ROS. Povećanje ROS uslijed hiperglikemije s posljedičnim oksidativnim stresom jedna od važnijih stavki u razvoju DN. Glavni izvori ROS su poliolni lanac, AGEs i NADPH oksidaza. Oksidativni stres povećava lokalnu i sistemsku upalu te direktno i indirektno dovodi do oštećenja bubrežnih stanica (podocita, mezangijskih i endotelnih stanica) koje su ključne za funkciju i strukturu glomerula (25, 26). Hiperglikemija je također odgovorna za stvaranje AGEs koji također mogu pokrenuti morfološke promjene tipične za DN (hipertrofiju i proliferaciju mezangijskih stanica, povećani opseg proizvodnje matriksa i zadebljanje GBM) (25). Ovi štetni učinci na bubrežne stanice određuju proteinuriju, težinu oštećenja tubulointercicija i fibrozu. Hiperglikemija također aktivira protein kinazu C (PKC), koja dovodi do sinteze endotelina-1 i faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), uzrokujući oštećenje glomerula i izravnu oksidaciju ključnih struktura kao što su DNK, ugljikohidrati, lipidi i proteini (25). Također i ROS dovode do povećane aktivacije PKC, ekspresije transformacijskog faktora rasta- $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* ; TGF- $\beta$ ) i povećane razine angiotenzina-II, potičući fibrotične procese u tubulointerciciju i remodeliranje izvanstaničnog matriksa u mezangiju (27,

28). Angiotenzin-II i RAAS također imaju jednu od ključnih uloga u patogenezi DN (29). Razlikujemo sistemski i lokalni (intrarenalni) RAAS i oba su uključena u patogenezu DN. Bubrežne stanice, lokalno mogu sintetizirati renin, reninske receptore, angiotenzinske receptore i angiotenzin-II, neovisno o sistemskom RAAS-u (29). Lokalna koncentracija angiotenzina-II u bubrežnom intersticiju je 1000 puta viša nego u plazmi i smatra se da on ima glavnu ulogu u nastanku oštećenja (30). Također je dokazano da visoka razina glukoze stimulira sintezu renina i angiotenzina-II u mezangijskim stanicama. Intrarenalni angiotenzin-II uzrokuje povećani glomerularni tlak, povećava propusnost glomerularnih kapilara uzrokujući proteinuriju, potiče proliferaciju i hipertrofiju bubrežnih stanica, povećava sintezu izvanstaničnog matriksa i citokina te dovodi do infiltracije makrofaga i upale (29).

Noviji dokazi ukazuju da imunološki i upalni odgovori igraju važnu ulogu u razvoju i progresiji DN, ali tradicionalno se DN ne smatra upalnom bolešću. Brojna istraživanja podupiru ulogu upalnih medijatora kao su interleukin (IL) -1, IL-18, IL-6, faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ; TNF- $\alpha$ ) i TGF- $\beta$  u razvoju DN (31). Razine ovih citokina u plazmi rastu s razvojem DN i neovisno su povezane s razvojem albuminurije. Nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) također je jedan od ključnih elemenata uključenih u upalni proces DN (25). On regulira sintezu staničnih proteina, upalnih citokina i kemokina koji pridonose oštećenju bubrega (32). Citokini, hiperglikemija, ROS, AGEs i angiotenzin-II mogu aktivirati put Janus kinaze/pretvornika signala i aktivatora transkripcije (engl. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*; JAK-STAT), koji je glavni posrednik između parakrine stimulacije i nuklearnih receptora (33). Aktivacija ovog puta ponovno dovodi do aktivacije NF- $\kappa$ B uspostavljajući začarani krug upale i razvoja DN (25). Drugi važan put aktiviran u DN je intraglomerularna hipertenzija izazvana glomerularnom hiperfiltracijom. To je jedan od prvih mehanizama odgovornih za pojavu albuminurije i smanjenja GF. Posredovan je o glukozi ovisnoj dilataciji glomerularnih aferentnih arteriola putem vazoaktivnih medijatora kao što su TGF- $\beta$ 1, VEGF, dušikov oksid (engl. *Nitric oxide*; NO), prostaglandini i glukagon (25).

Protein 3 nalik NOD receptoru (engl. *NOD-like receptor protein 3*; NLRP3) je višeproteinski signalni kompleks (inflamatom) i sastavni dio kroničnog upalnog odgovora. Važan je posrednik urođenog imunog upalnog odgovora na podražaje kao što su izvanstanični signali (npr. ATP) ili patogeni (npr. bakterije). Aktivacija NLRP3 sastoji se od procesa u dva koraka, koji uključuje pripremu posredovanu NF- $\kappa$ B i aktivaciju. Početni signal (npr. ATP) aktivira NF- $\kappa$ B, koji se premješta u jezgru kako bi pojačao ekspresiju NLRP3, pro-IL1 $\beta$  i pro-IL18. Nakon toga se jednim od tri pretpostavljena mehanizma (kanonski, nekanonski ili alternativni) aktivira kaspaza-1, što rezultira stvaranjem i oslobađanjem upalnih citokina IL-1 $\beta$

i IL-18 (34). Aktivacija NLRP3 povezana je s nekoliko kliničkih biljega DN kao što su proteinurija, albuminurija te s morfološkim promjenama kao ekspanzija mezangija (35, 36).

Unatoč opsežnim studijama, patofiziološki mehanizmi DN nisu u potpunosti shvaćeni i potrebni su novi terapijski pristupi (29). Sve veći broj novijih studija ukazuje na ulogu izravne komunikacije između stanica i parakrinog ATP-a u patofiziologiji DN, pri čemu glavnu ulogu imaju kanali formirani od koneksina (37-41). Međutim, unatoč njihovoj središnjoj ulozi u signalizaciji posredovanoj ATP-om, uloga paneksina u DN još nije istražena. U nedavnoj studiji na modelu šećerne bolesti tipa 1 izazvane streptozotocinom u štakora, pronađena je gotovo isključivo ekspresija Panx1 u distalnim tubularnim stanicama dijabetičnih štakora, ali ne i kod zdravih jedinki – kontrolne skupine (42). Budući da je otkriveno da su stanice distalnih tubula bile najteže oštećene u tom modelu dijabetesa (43), zaključeno je da bi Panx1 mogao igrati ulogu u oštećenju distalnih tubula tijekom dijabetesa.

### 1.2.2. Dijagnoza dijabetičke nefropatije

Dijagnoza DN najčešće se postavlja klinički kada su zadovoljeni slijedeći uvjeti: perzistentna albuminurija (>300 mg/dan) ili trajno smanjena (GF <60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> tijekom >3 mjeseca), dugo trajanje dijabetesa (>5 god kod šećerne bolesti tipa 1) ili utvrđena dijabetička retinopatija, te procjena da su druge etiologije malo vjerojatne (44). Značajke koje mogu ukazivati na druge oblike bubrežne bolesti su: naglo pogoršanje proteinurije ili pojava nefrotskog sindroma, brzi pad GF (>5 ml/min/godišnje), aktivni sediment urina (npr. hematurija s prisutnim dizmorfnim eritrocitima) ili prisutnost druge sistemske bolesti (21).

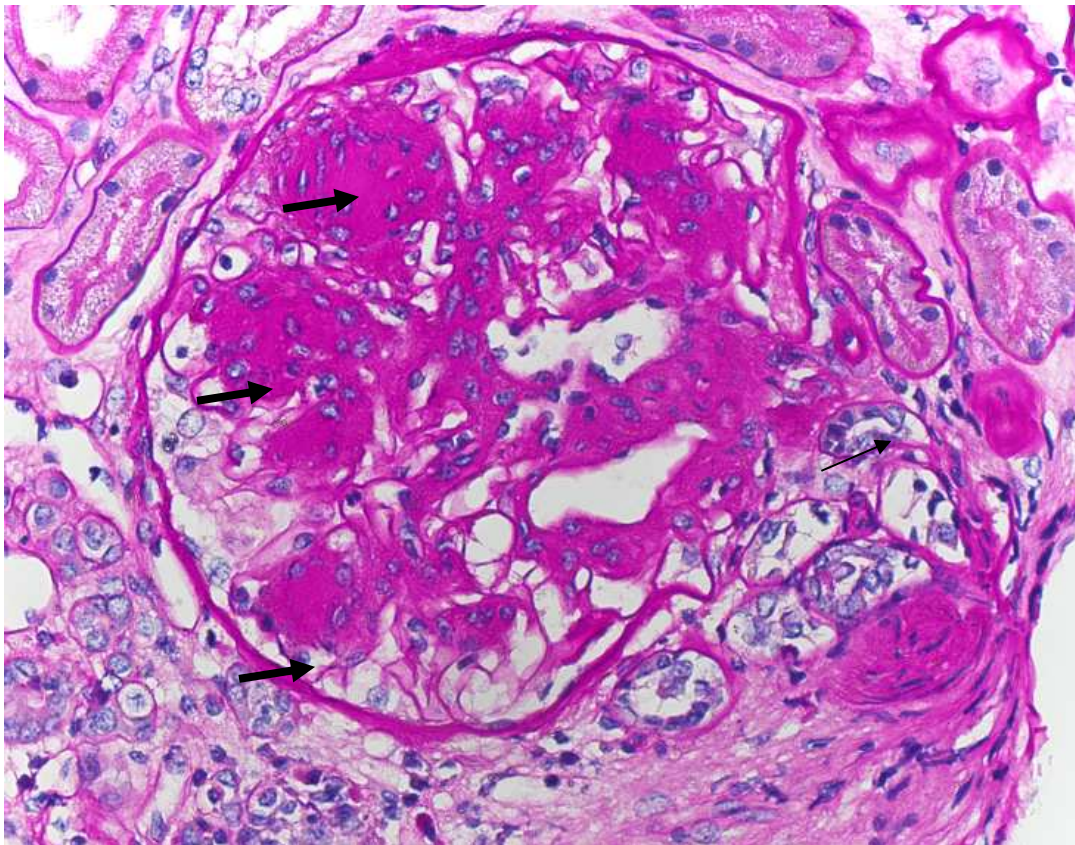
Biopsija bubrega je zlatni standard za postavljanje dijagnoze DN, ali koristi se samo u rijetkim slučajevima kada se sumnja na neki drugi uzrok bubrežnog oštećenja. Tipične histološke promjene karakterizirane su zadebljanjem GBM, proširenjem mezangija i nodularnom glomerulosklerozom, te su u međunarodnom klasifikacijskom sustavu podijeljene u 4 razreda - I do IV (45):

- **Razred I** – izolirano zadebljanje GBM na elektronskom mikroskopu i blage, nespecifične promjene na svjetlosnom mikroskopu koje ne zadovoljavaju kriterije razreda II do IV.
- **Razred IIa** - blago proširenje mezangija, nalaz biopsije ne zadovoljava kriterije za razred III ili IV.



- **Razred IIb** - jako proširenje mezangija (>25%), ali bez nodularne skleroze (Kimmelstiel-Wilsonove lezije) ili globalne glomeruloskleroze u više od 50% glomerula.
- **Razred III** - nodularna skleroza (Kimmelstiel-Wilsonova lezija): najmanje jedan glomerul s nodularnim povećanjem mezangijalnog matriksa (Kimmelstiel-Wilson) bez promjena opisanih u razredu IV. (Slika 5)
- **Razred IV** - uznapredovala dijabetička glomeruloskleroza: glomerularna skleroza u više od 50% glomerula s drugim kliničkim ili patološkim dokazima da se skleroza može pripisati DN.

Osim ovih karakterističnih glomerularnih značajki, također su često prisutne intersticijska fibroza i tubularna atrofija (IFTA), intersticijska fibroza, arteriolarna hijalinoza i arterioskleroza (21, 22). Nodularna glomeruloskleroza karakterizirana je prisustvom eozinofilnih Kimmelstiel-Wilsonovih nodula na glomerularnoj periferiji i patognomonična je za DN, ali nazočna samo u 10-20% bolesnika s DN (22).



**Slika 5.** Primjer morfoloških lezija u DN. Na slici je prikazan glomerul s Kimmelstiel–Wilsonovim lezijama (strelice) - razred III. Iz zbirke Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split, susretljivošću Ane Dunatov, dr. med.

### **1.2.3. Prognoza dijabetičke nefropatije**

Klinički ishodi dijabetičke bubrežne bolesti izuzetno su varijabilni. Hiperglikemija, hipertenzija, pretilost, pušenje, rasa, muški spol, dislipidemija, dob i genetski čimbenici glavni su čimbenici rizika za razvoj i progresiju DN (29). Osobe s dijabetesom koje razviju DN izložene su povećanom riziku od progresije KBB, kardiovaskularnim događajima i smrtnosti (21). Kao što je prethodno navedeno DN najčešći je uzrok zatajenja bubrežne funkcije – 30-50% bolesnika (19). Ipak, rizik od smrtnosti (većinom uslijed kardiovaskularnih događaja) znatno je veći od rizika progresije KBB u završni stupanj bubrežnog zatajenja (29).

### **1.2.4. Liječenje dijabetičke nefropatije**

Specifično liječenje bolesnika s DN može se podijeliti u 4 glavna cilja: smanjenje kardiovaskularnog rizika, kontrola glikemije, kontrola arterijskog tlaka i inhibicija RAAS-a. Najvažnije komponente terapijskog pristupa u smanjivanju kardiovaskularnog rizika uključuju terapiju hiperlipidemije i promjenu životnih navika (prestanak pušenja, gubitak prekomjerne težine i povećanu tjelesnu aktivnost, smanjeni unos soli). Dobra kontrola glikemije ( $HbA1c < 7\%$ ) povoljno utječe na razvoj i progresiju DN i dokazana je brojnim kliničkim ispitivanjima (21). Kontrola arterijske hipertenzije ( $<130/80$  mmHg) ključna je za smanjenje rizika progresije KBB i kardiovaskularnog rizika. Potvrđeno je da za svakih 10 mmHg sniženog sistoličkog arterijskog tlaka postoji 17% manji rizik od smrtnosti, 11% smanjeni rizik kardiovaskularnih događaja i 17% manji rizik razvoja albuminurije (46). Lijekovi koji inhibiraju RAAS (ACE inhibitori, blokatori angiotenzinskih receptora, antagonisti mineralokortikoidnih receptora) pokazali su najveću pojedinačnu učinkovitost i kamen su temeljac u liječenju DN - smanjuju albuminuriju, reguliraju arterijski tlak i smanjuju pojavnost i progresiju KBB (21). Od novih terapija važno je napomenuti inhibitore natrij-glukoznog ko-transporta 2 (SGLT2) koji su relativno novi lijekovi odobreni za liječenje šećerne bolesti ali sa značajnim učinkom na smanjenje progresije DN (29).

## **1.3. PANEKSINI**

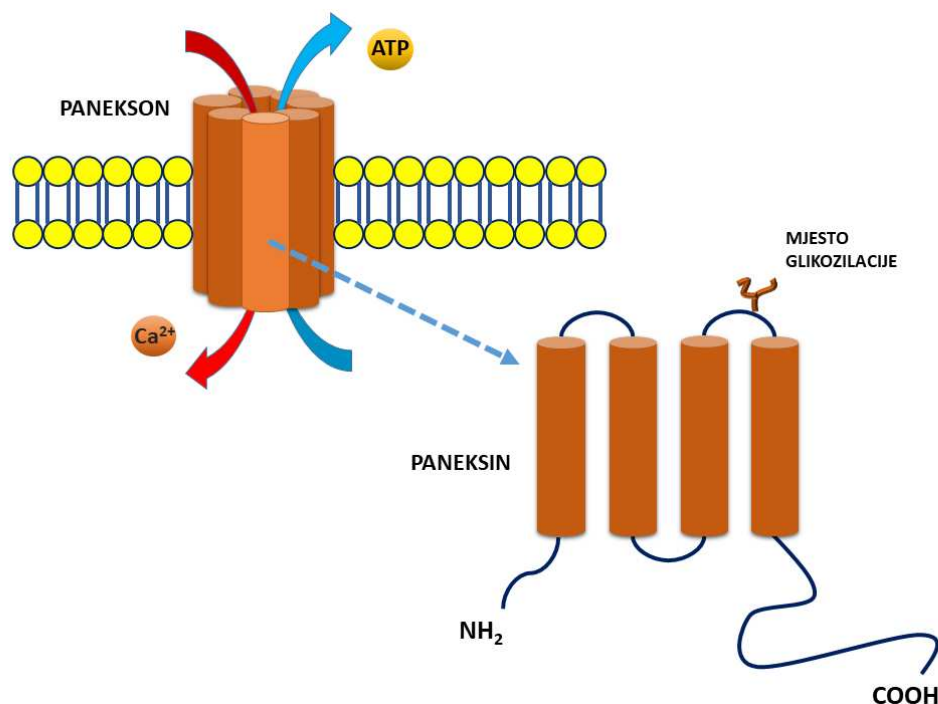
Naziv paneksin izveden je iz grčke riječi *pan* (potpun/posvuda) i latinske riječi *nexus* (spoj). Postoje tri izoforme paneksina: Panx1, Panx2 i Panx3 (47, 48). Paneksini čine

transmembranske kanale velikog promjera, povezujući unutarstanični i izvanstanični prostor te dopuštajući stanično otpuštanje ATP-a u izvanstanični milje, pa na taj način igraju važnu ulogu u parakrinoj komunikaciji između stanica (47, 49-51). Poznato je da je ATP glavna izvanstanična molekula u purinergičkoj signalizaciji, a njegovo oslobađanje posredovano kanalima građenim od Panx1 igra važnu ulogu u fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Panx1 je izražen u raznim tkivima i vrstama stanica uključujući endotel, epitelne stanice, eritrocite, trombocite, limfocite, adipocite, mišiće, mozak, slezenu, hrskavicu, kožu, jetru, bubrege, mokraćni mjehur, pluća i debelo crijevo (51, 52). Panx2 najviše je izražen u središnjem živčanom sustavu, a manje u drugim tkivima kao testis, bubreg i gastrointestinalni trakt (53). Panx3 uglavnom je lokaliziran u koži, osteoblastima i hondrocitima (53). Panx1 i Panx3 lokalizirani su primarno na membrani stanice, dok je Panx2 najviše izražen u citoplazmatskom odjeljku, što ukazuje na njegovu unutarstaničnu funkciju (53).

### 1.3.1. Struktura i funkcija

Paneksin 1 je transmembranski heptamerni glikoprotein. Svaki Panx1 protomer posjeduje četiri transmembranske domene, dvije izvanstanične petlje, unutarstaničnu petlju i citosolne C- i N-krajeve (Slika 6). Smatra se da C-terminalni kraj inhibira aktivnost Panx1 po principu kugličnog i lančanog mehanizma (48). Do danas je predloženo nekoliko različitih mehanizama koji reguliraju funkciju paneksinskih kanala. Pretpostavlja se da se paneksinski kanali aktiviraju cijepanjem C-terminalnog kraja kanala koje je posredovano kaspazom, mehaničkim stresom, visokim unutarstaničnim koncentracijama kalcija i  $\alpha$ 1-adrenergičkom stimulacijom (48, 53). Cijepanje Panx1 kaspazom je opisano kao mehanizam koji uzrokuje trajno aktiviranje i povećanje propusnosti kanala, što dovodi do apoptoze stanice (54).

Panx1 su glikozilirani na izvanstaničnoj petlji i to je jedino identificirano mjesto glikozilacije (Slika 6). N-glikozilacija olakšava promet, kontrolu kvalitete i savijanje proteina Panx1 (54). Pokazalo se da sprječavanje glikozilacije smanjuje ekspresiju na površini stanice. Čini se da C-terminalni kraj također stupa u interakciju s mikrofilamentima aktina, koji olakšavaju proces propuštanja i stabiliziraju Panx1 na membrani (48).

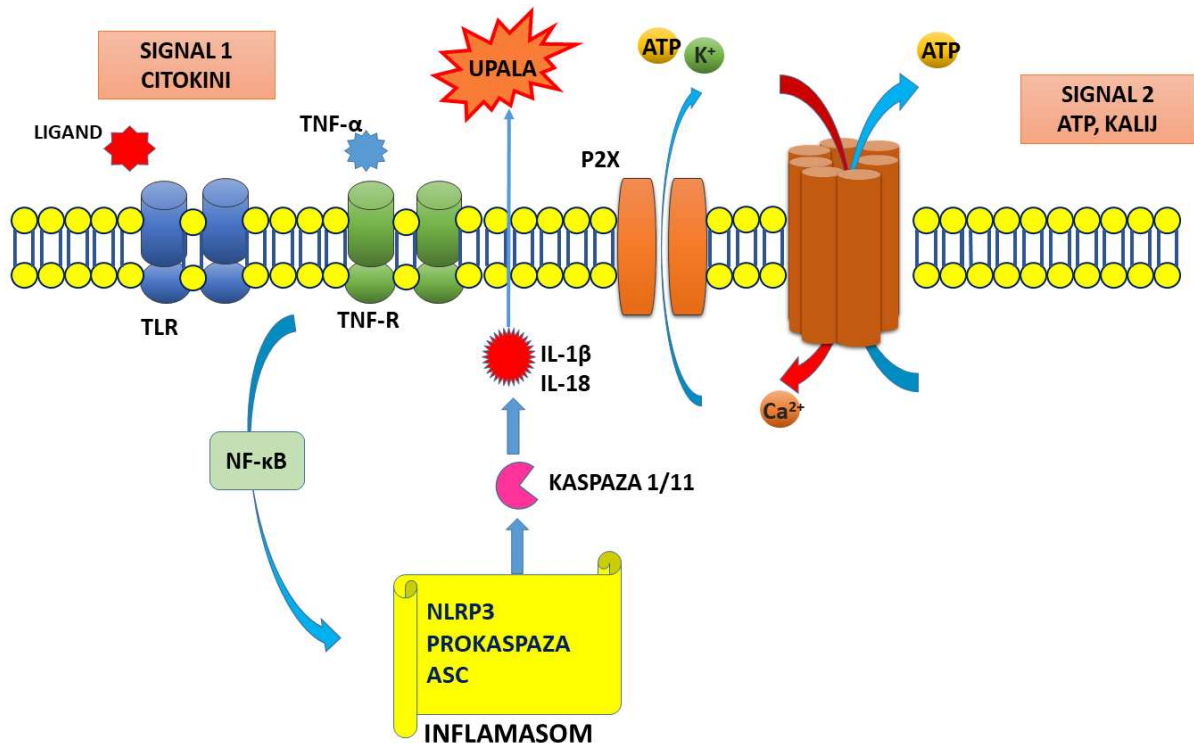


**Slika 6.** Struktura Panx1 podjedinice i heptamernog kanala. Izradio autor.

Panx1 formira anionski selektivni kanal koji omogućuje prolaz iona i molekula molekularne težine do 1000 Da (47). Oni su uključeni u purinergičku signalizaciju kroz otpuštanje ATP-a iz stanica u različitim fiziološkim i patološkim procesima (49, 50). ATP je ključna izvanstanična signalna molekula, a njegovi hidrolitički proizvodi adenzin difosfat, adenzin monofosfat i adenzin su agonisti različitih važnih receptora kao što su P2X i P2Y receptori. Sedam je izoformi P2X-receptora od čega pet izoformi (P2X1-4 i P2X7) stupaju u interakciju s paneksinima (53). To su kationski kanali selektivni za ione kalija, natrija i kalcija. Aktivacija Panx1-P2X7 signalnog kompleksa je uključena u imunološki odgovor i staničnu smrt (53). Smatra se da P2Y-Panx1 signalizacija sudjeluje u regulaciji aktivacije endotelne stanice u vaskularnoj upali regulaciji staničnog volumena (53). Poznato je da paneksinski kanali sudjeluju u aktivaciji inflammasoma i oslobađanju proupalnih citokina, aktivaciji i migraciji leukocita, te su uključeni u različite vrste stanične smrti (apoptoza, piroptoza, autofagija) (52).

Zabilježeno je da Panx1-P2X7 kompleks aktivira inflammasome (kao npr. NLRP3) u mnogim tipovima stanica. Dva su glavna signala potrebna za aktivaciju inflammasoma. Signal 1 je posredovan citokinima iz okoline putem TNF, IL-1 i *Toll-like* receptora, koji zatim putem NF- $\kappa$ B puta reguliraju ekspresiju IL-1 $\beta$ , kaspaze 1/11 i *Nod-like* receptore. Signal 2 je reguliran preko Panx1-PX2 signalosoma te regulira sklapanje inflammasoma i obradu prekursora kaspaze

1/11, IL-1 $\beta$  i IL18. Ovaj signal reagira na mehanički stres, izvanstanični ATP ili aktivaciju sustava za otkrivanje liganda unutar citosola. Nakon aktivacije aktivnost kaspaze regulira sazrijevanje i oslobađanje IL-1 $\beta$  i IL-18 (53, 55). Membranski protein Gasdermin D, koji se također cijepa upalnim kaspazama 1/11, stvara pore kroz koje prolaze zreli IL1 $\beta$ , IL18 i kaspaza 1/11. Stvaranje pora također remeti osmotski potencijal stanice, što rezultira upalnim oblikom stanične smrti poznatim kao piroptoza (53, 56). Opisana kaskada je prikazana na Slici 7.



**Slika 7.** Shematski prikaz dva signalna puta kaskade aktivacije inflammasoma. Izradio autor.

Oslobađanje ATP-a preko kanala građenih od Panx1 (Panx1-kanala) povezano je s upalom na više razina. Na primjer, otpuštanje ATP-a putem Panx1-kanala neophodno je za odgovarajuće čišćenje apoptotskih stanica (54). Aktivacija Panx1-kanala uzrokuje istjecanje ATP-a, koji onda služi kao molekularni obrazac povezan s oštećenjem tkiva (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), aktivira urođeni imuni sustav u interakciji s receptorom za prepoznavanje uzorka (engl. *pattern recognition receptor*; PRP) te pokreće upalu regrutiranjem upalnih stanica na mjesto ozljede (48). Otpuštanje ATP-a regulirano je u akutnoj upali i ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi preko TNF $\alpha$ . Također se pokazalo da TNF $\alpha$  putem Panx1 pojačava učinke kronične upale na endotelne stanice poticanjem sinteze IL-1 $\beta$  kroz put

ovisan o kalciju i NF- $\kappa$ B (57). Osim navedenoga, jasno je opisana uloga Panx1 u regulaciji akutne faze upale (putem oslobađanja ATP-a), kao i kronične faze upale (putem reguliranja utoka  $\text{Ca}^{+2}$ ) (54).

Purinergičko signaliziranje ima ključnu ulogu tijekom ishemijsko-reperfuzijske ozljede, budući da se ATP oslobađa iz apoptotičnih stanica, aktiviranog endotela, upalnih stanica i nekrotičnih stanica (54). Akumulacija ATP-a djeluje kao signal "pronađi me", koji regrutira fagocite na mjesto ozljede promičući kemotaksiju upalnih stanica ili aktivirajući inflamatom NLRP3. Ovo potiče otpuštanje citokina kao što su IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , koji reguliraju fenotip vaskularnih stanica tijekom akutne sistemske upale te pojačavaju ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu poticanjem pretjeranog upalnog odgovora (54).

Nekoliko studija je pokazalo da Panx1 ima ulogu u kontroli otpuštanja ATP-a iz adipocita, što je važno za aktivaciju inzulinom induciranog unosa glukoze (58). Na temelju toga se pretpostavlja da bi Panx1 mogao imati ulogu u patofiziologiji inzulinske rezistencije (47).

Brojne studije su pokazale da Panx1 osim svoje fiziološke uloge posreduje i u različitim patološkim procesima. Do sada je opisana uloga Panx1 u patogenezi brojnih bolesti kao što su: cerebrovaskularni inzult, multipla skleroza, epilepsija, migrena, ateroskleroza, hipertenzija, infarkt miokarda, bakterijska upala, HIV i COVID 19 infekcija, akutno oštećenje bubrega, karcinomi, itd. (48, 53, 54, 59-61).

S obzirom na njegovu ulogu u različitim patofiziološkim putevima, Panx1 se sve više razmatra kao cilj u terapijskim postupcima. Danas je poznato preko 30 inhibitora koji pokazuju različite stupnjeve specifičnosti prema paneksinima. Sastoje od blokatora tijesnih spojeva ili transportera, mimetičkih peptida, antagonista P2X7 receptora i antimalarika. Neki od njih su dobro poznati kao meflokin, probenecid, trovafloksacin, karbenoksolon i spironolakton (48, 54).

### **1.3.2. Paneksin 1 i bubreg**

Distribucija Panx1 opsežno je proučavana u mišjem bubregu. Utvrđeno je da je prisutan u apikalnom dijelu stanica bubrežnih tubula (uključujući proksimalni zavijeni kanalić, tanki silazni krak Henleove petlje i sabirni kanalić), endotel bubrežnih žila, glatke mišićne stanice bubrežnih arterija, uključujući aferentnu arteriolu, te u podocitima, bilo nativnim ili kultiviranim (13, 62-64). Smatra se da Panx1 ima nekoliko funkcija u bubrezima kao što su

kontrola vaskularne funkcije te transport tekućine i elektrolita kroz epitelne stanice tubula (13). Osim toga, predložena je i uloga Panx1 u kontroli arterijskog tlaka nakon što je nedavna studija dokumentirala ulogu Panx1 u regulaciji lučenja renina (65).

Proučavana je njihova uloga u razvoju akutne ozljede bubrega (AOB), a farmakološko ciljanje Panx1 kanala je sprječilo tubularnu ozljedu u različitim modelima AOB kod miševa (61, 63, 66). Epitelne stanice bubrežnih tubula izuzetno su osjetljive na intrinzični oksidativni stres, osobito tijekom reperfuzijske faze ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda glavni je uzrok AOB kod hospitaliziranih bolesnika. Također je i jedna od komplikacija šećerne bolesti koja može dovesti do KBB. Aktivacija Panx1-kanala posreduje otpuštanje ATP i pospješuje aktivaciju inflammasoma NLRP3, otpuštanje upalnih citokina i oštećenje bubrega. Aktivacija inflammasoma NLRP3 povezana je s upalom i oštećenjem bubrega kod AOB izazvane ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom (67). Na temelju tih rezultata smatra se da bi suzbijanje aktivacije inflammasoma NLRP3 izazvane kaspazom-11 moglo bi imati korisne učinke u ublažavanju AOB (67). Tijekom AOB tubul nije samo ključno mjesto ozljede, već i važan izvor upalnih citokina koji su glavna odrednica ozljede i oporavka (54). Na mišjem modelu AOB je dokazano da inhibicija Panx1 smanjuje sintezu IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ , kao i apoptozu tubularnih stanica (61).

Većina podataka o fiziološkoj i patofiziološkoj ulozi Panx1 u bubrezima dobivena je proučavanjem mišjih modela. Samo jedna studija je proučavala ekspresiju Panx1 u ljudskom bubregu, u pacijenata s AOB uzrokovane sepsom (61). Međutim, detalji o staničnoj distribuciji Panx1 u ljudskom bubregu nisu poznati. Štoviše, ekspresija Panx1 u embrionalnom razvoju ljudskog bubrega nije do sada proučavana. Osim toga, nema podataka o ekspresiji Panx1 u bubrezima dijabetičara, jer do danas niti jedna studija nije istraživala ulogu paneksina u oštećenju glomerula i tubula tijekom dijabetesa kod ljudi.

S obzirom da je ranije prikazana uloga inflammasoma NLRP3 u oštećenju bubrega kod dijabetičara, možemo pretpostaviti da bi suzbijanje njegove aktivacije imalo korisne učinke u liječenju DN. Jedan od načina je i djelovanjem na inhibiciju Panx1 kanala, s obzirom da su važni u aktivaciji NLRP3.

## **2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**



S obzirom na prethodna istraživanja za pretpostaviti je da:

1. Izražaj Panx1 u različitim fazama razvoja bubrega ljudskih zametaka ima važnu ulogu tijekom razvoja bubrega kod čovjeka.
2. Šećerna bolest utječe na izražaj i distribuciju Panx1 u bubrezima.
3. Promjene izražaja Panx1 u bubregu uzrokovane šećernom bolešću povezane su sa stupnjem oštećenja bubrega.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

S obzirom na prethodne hipoteze ciljevi su:

1. Istražiti staničnu distribuciju Panx1 u ljudskom bubregu tijekom embrionalnog razvoja i ranog fetalnog razdoblja, u ranom postnatalnom razdoblju te u bubregu odraslih osoba.
2. Utvrditi utjecaj šećerne bolesti na izražaj i distribuciju Panx1 u bubregu čovjeka, a što bi moglo ukazati na njegovu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije.
3. Utvrditi postoji li povezanost izražaja Panx1 u bubregu bolesnika sa šećernom bolešću i stupnja oštećenja bubrega.

## **4. MATERIJALI I METODE**

#### **4.1. Nabava i obrada tkiva**

Ljudski zametci dobiveni su s Klinike za ženske bolesti i porode te Zavoda za patologiju nakon spontanijeh pobačaja ili izvanmaternične trudnoće i obrađeni uz odobrenje Povjerenstva za etiku i lijekove KBC-a Split (razred: 003-08/16-03/0001, broj odobrenja: 2181-198-03-04-16-0024), u skladu s Helsinškom deklaracijom (68). Loše očuvani uzorci su odbačeni. Starost zametaka procijenjena je na temelju vanjskih mjerenja (duljina tjeme - trtica) i Carnegiejevih stadija (69). Prikupljeno je ukupno 6 normalnih ljudskih zametaka između 5. i 10. tjedana razvoja, a postnatalno tkivo prikupljeno je prilikom autopsije zdravog 1.5-godišnjeg djeteta. Uzorci su fiksirani u 4% puferiranom formalinu u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, pH 7,4).

Također smo analizirali bubrege 41 bolesnika koji su podvrgnuti nefrektomiji zbog karcinoma bubrega u posljednje tri godine u KBC-u Split - 21 bolesnik sa šećernom bolešću tipa 2 i 20 bolesnika bez dijabetesa. Zdravo tkivo u blizini karcinoma je odvojeno i fiksirano uranjanjem u puferirani 4% formalin. Laboratorijski podaci u vrijeme nefrektomije dobiveni su iz bolničke dokumentacije. Za istraživanje je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva KBC-a Split (klasa: 500-03/21-01/158, broj odobrenja: 2181-147/01/06/M.S.-21-02).

#### **4.2. Imunohistokemijski postupak**

Uzorci tkiva i embrija isprani su nekoliko puta u PBS-u, dehidrirani u otopinama etanola i utopljeni u parafin, standardnim postupkom. Parafinski blokovi su izrezani u poprečnoj ravnini (5 µm), a rezovi su postavljeni na stakalca.

Rezovi su zatim deparafinizirani u ksilenu i rehidrirani korištenjem otopina etanola u vodi opadajućih koncentracija i isprani destiliranom vodom. Otkrivanje antigena postignuto je zagrijavanjem u puferu natrijeva citrata (pH 6,0) kroz 30 minuta u parnom kuhlalu. Stakalca su zatim ohlađena na sobnu temperaturu, isprana u PBS-u i inkubirana s blokirajućim puferom (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) tijekom 20 minuta. Blokirajući pufer je uklonjen i nanesena je kombinacija primarnih protutijela (Tablica 1) razrijeđena u PBS-u. Rezovi su su inkubirani s primarnim protutijelima preko noći u vlažnoj komori. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani 1 sat u vlažnoj komori s odgovarajućom kombinacijom sekundarnih protutijela (Tablica 1).

**Tablica 1.** Korištena primarna i sekundarna protutijela.

|          | Protutitijelo   | Šifra br.     | Domaćin | Razrjeđivanje | Izvor  |
|----------|---|---------------|---------|---------------|--|
| Primarna | Anti-pannexin<br>1/PANX1  | ABN242        | Kunić   | 1:300         | Merck KGaA,<br>Darmstadt,<br>Germany                       |
|          | Anti-nephrin (B-12)   | sc-<br>377246 | Miš     | 1:50          | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>Inc., Santa<br>Cruz, CA,USA |
|          | Anti-Aquaporin<br>1/AQP1 (B-11)   | sc-25287      | Miš     | 1:50          | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>Inc., Santa<br>Cruz, CA,USA |
|          | Anti-Aquaporin<br>2/AQP2 (E-2)  | sc-<br>515770 | Miš     | 1:50          | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>Inc., Santa<br>Cruz, CA,USA |
|          | Anti-Renin [7D3-<br>E3]   | ab134783      | Miš     | 1:50          | Abcam,<br>Cambridge,<br>UK                                 |
|          | Anti-Smooth<br>Muscle Actin   | M0851         | Miš     | 1:300         | Dako,<br>Glostrup,<br>Denmark                              |
| Lektini  | Fluorescein labeled<br><i>Dolichos Biflorus</i><br>agglutinin (DBA)           | FL-1031       | -       | 1:400         | Vector<br>Laboratories<br>Ltd.,<br>Peterborough,<br>UK     |
|          | Fluorescein labelled<br><i>Lotus</i><br><i>Tetragonolobus</i><br>lectin (LTL) | FL-1321       | -       | 1:400         | Vector<br>Laboratories<br>Ltd.,<br>Peterborough,<br>UK     |

|            |                              |          |         |       |                |
|------------|------------------------------|----------|---------|-------|----------------|
|            | Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 | 715-545- | Magarac | 1:400 | Jackson        |
|            | AffiniPure Anti-             | 150      |         |       | Immuno         |
|            | Mouse IgG (H+L)              |          |         |       | Research       |
|            |                              |          |         |       | Laboratories,  |
|            |                              |          |         |       | Inc.,          |
|            |                              |          |         |       | Baltimore, PA, |
|            |                              |          |         |       | USA            |
| Sekundarna | Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 | 711-545- | Magarac | 1:400 | Jackson        |
|            | AffiniPure Anti-             | 152      |         |       | Immuno         |
|            | Rabbit IgG (H+L)             |          |         |       | Research       |
|            |                              |          |         |       | Laboratories,  |
|            |                              |          |         |       | Inc.,          |
|            |                              |          |         |       | Baltimore, PA, |
|            |                              |          |         |       | USA            |
|            | Rhodamine Red <sup>™</sup> - | 715-295- | Magarac | 1:400 | Jackson        |
|            | X (RRX) AffiniPure           | 151      |         |       | Immuno         |
|            | Anti-Mouse IgG               |          |         |       | Research       |
|            | (H+L)                        |          |         |       | Laboratories,  |
|            |                              |          |         |       | Inc.,          |
|            |                              |          |         |       | Baltimore, PA, |
|            |                              |          |         |       | USA            |
|            | Rhodamine Red <sup>™</sup> - | 711-295- | Magarac | 1:400 | Jackson        |
|            | X (RRX) AffiniPure           | 152      |         |       | Immuno         |
|            | Donkey Anti-Rabbit           |          |         |       | Research       |
|            | IgG (H+L)                    |          |         |       | Laboratories,  |
|            |                              |          |         |       | Inc.,          |
|            |                              |          |         |       | Baltimore, PA, |
|            |                              |          |         |       | USA            |

Rezovi su zatim isprani u PBS-u i jezgre su obojene s 4'6'-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). U slučaju dvostrukog bojenja s lektinima, odgovarajući lektin (*Lotus Tetragonolobus* lektin - LTL ili *Dolichos Biflorus* aglutinin - DBA) je primijenjen prije bojenja jezgara i inkubiran u tamnoj vlažnoj komori na sobnoj temperaturi tijekom 1 sata, ispran u PBS-u i jezgre su nakon toga obojene DAPI-jem. Nakon konačnog ispiranja destiliranom vodom, stakalca su

pokrivena (Immumount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Isključivanje primarnog protutijela iz postupka rezultiralo je izostankom bojenja u tkivu.

#### **4.3. Prikupljanje i analiza podataka**

Obojeni rezovi pregledani su i fotografirani mikroskopom BX51 (Olympus, Tokio, Japan) opremljenim hladnom digitalnom kamerom (DS-Ri2; Nikon, Tokio, Japan) pomoću softvera NIS-Elements F. Korišteni objektivi bili su: UPLFLN4X, UPLFLN10X2, UPLFLN40X i UPLFLN100XO2 (svi Olympus, Tokyo, Japan). Zelene granularne nakupine protumačene su kao pozitivna Panx1 imunoekspresija; osim u slučaju ko-lokalizacije s lektinima (LTL i DBA) i reninom, gdje su crvene granularne nakupine protumačene kao pozitivna Panx1 imunoekspresija. Kako bi se kvantificirala Panx imunoekspresija u glomerulima bubrega dijabetičnih i nedijabetičnih pacijenata, analizirana su vidna polja snimljena pri objektivnom povećanju od 40× i konstantnom vremenu izlaganja (za analizu glomerula), a za analizu tubularno-intersticijalnog odjeljka, korišten je x20 objektiv za snimanje 10 nepreklapajućih polja koja su sadržavala kortikalne tubule. Svako polje činilo jednu sliku.

Mikrofotografije su obrađene i analizirane pomoću softvera ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Crveni protusignal oduzet je od slika sa zelenim bojanjem. Primijenjen je filter medijana s radijusom od 5,0 piksela za glomerule i 7,0 piksela za područje tubula/intersticija, a granični prag određen je pomoću algoritma za određivanje praga "Triangle". Postotak fluorescencije u području određen je pomoću funkcije Analyze Particles. Za analizu glomerula, pojedine strukture su ručno ocrtane i izolirane pomoću programa Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, Kalifornija, SAD), dok je cijelo područje slike korišteno za analizu odjeljka tubula/intersticija. Zatim su fotografije obrađene kako je gore opisano i izračunat je postotak površine udjela u glomerulima/tubulima. Za potrebe prezentacije napravljeno je oduzimanje pozadine i kontrastiranje.

#### **4.4. Statistička analiza**

Normalnost distribucije podataka procijenjena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Mann-Whitneyjev test korišten je za usporedbu razlika između skupina pacijenata. Za



utvrđivanje korelacije između varijabli korišten je Spearmanov korelacijski test. Izračuni su provedeni korištenjem Statistical Package for Social Science (SPSS, verzija 23.0). P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je značajnom.

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun su korišteni preliminarni podaci iz pilot pokusa na šest uzoraka dobiveni analizom fotografija kore bubrega za izražaj Panx1 u glomerulima, sa sljedećim parametrima;  $\mu_1 = 12,3$ ,  $\mu_2 = 6,8$ ,  $\sigma = 4,2$ ,  $\text{power} = 80\%$ ,  $p = 0,05$ , pri čemu je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka  $n = 10$ .

## **5. REZULTATI**

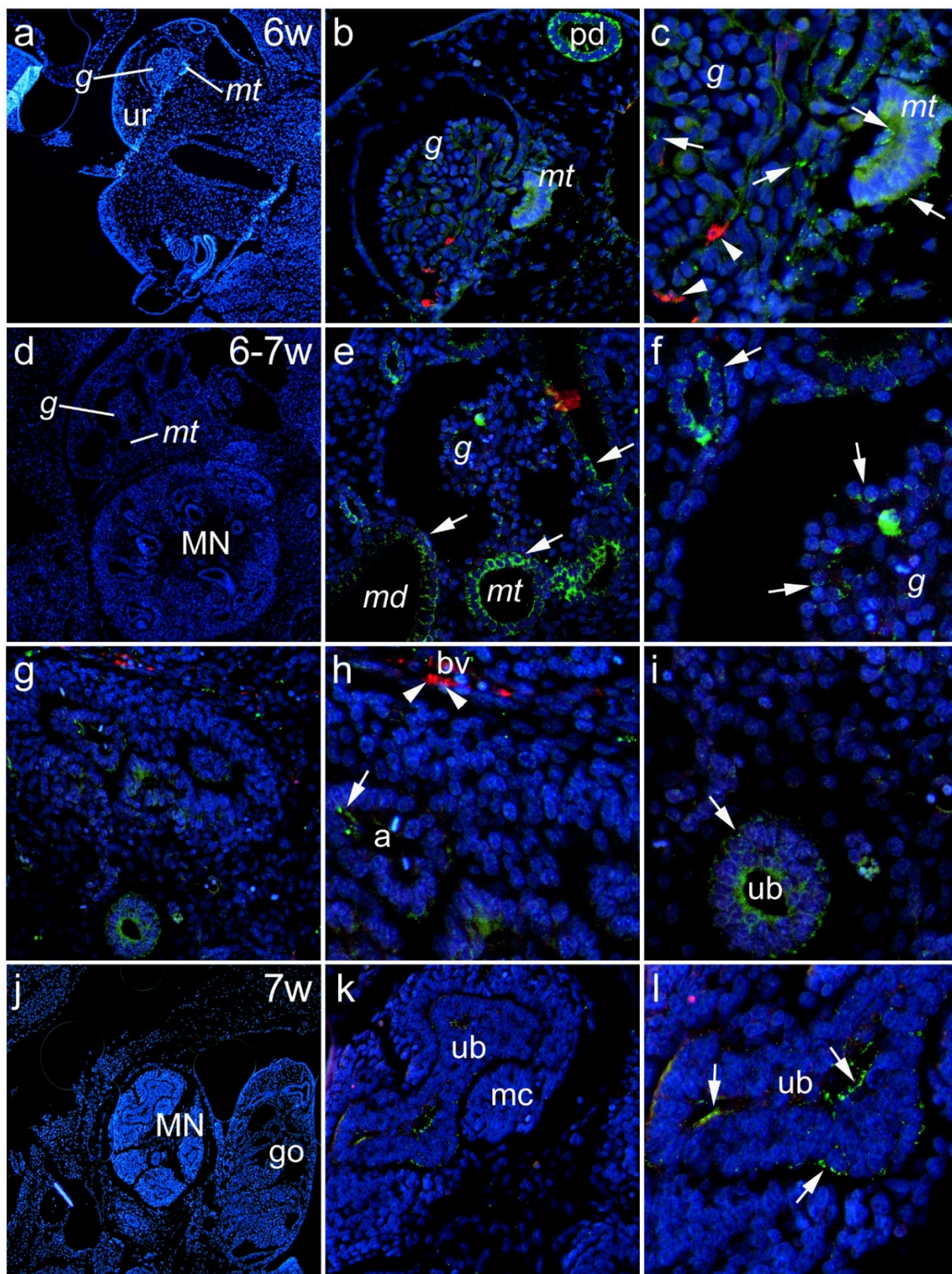
## **5.1. Bubrežna ekspresija Panx1 u ljudskom bubregu tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja.**

### **5.1.1. Šesti do sedmi tjedan razvoja**

Ispitali smo bubrežnu ekspresiju Panx1 tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja. Tijekom 6. tjedna razvoja u urogenitalnom naboru mogu se vidjeti mezonefričke strukture (mezonefrički glomeruli i tubuli) (Slika 9a). Ekspresija Panx1 pronađena je u mezonefričkim glomerulima i mezonefričkim tubulima, dok su aSMA-pozitivne (engl. *Alpha-Smooth Muscle Actin*; aSMA) stanice videne u stijenkama krvnih žila unutar glomerula. Osim toga, snažna Panx1 imunoreaktivnost uočena je u paramezonefričkom kanalu (Slika 9b). Panx1 imunofluorescencija bila je prisutna u aSMA-imunoreaktivnim stanicama (Slika 9c).

Na prijelazu iz 6. u 7. embrionalni tjedan, obje mezonefričke strukture (glomeruli i mezonefrični kanal) te metanefričke strukture vide se u neposrednoj blizini (Slika 9d). Jaka Panx1 imunoreaktivnost pronađena je u mezonefričkim tubulima i mezonefričkom kanalu (Slika 9d-f). Panx1-imunoreaktivne stanice vidljive su u pupoljku uretera u metanefrosu i u ampulama, dok se aSMA-pozitivne stanice nalaze u krvnim žilama (Slika 9g-i).

U 7. tjednu razvoja u metanefričkim strukturama uočena je snažna Panx1 imunoreaktivnost u pupoljku uretera u razvoju, dok u metanefričkoj čašici Panx1 imunoreaktivnost nije nađena (Slika 9k-l).



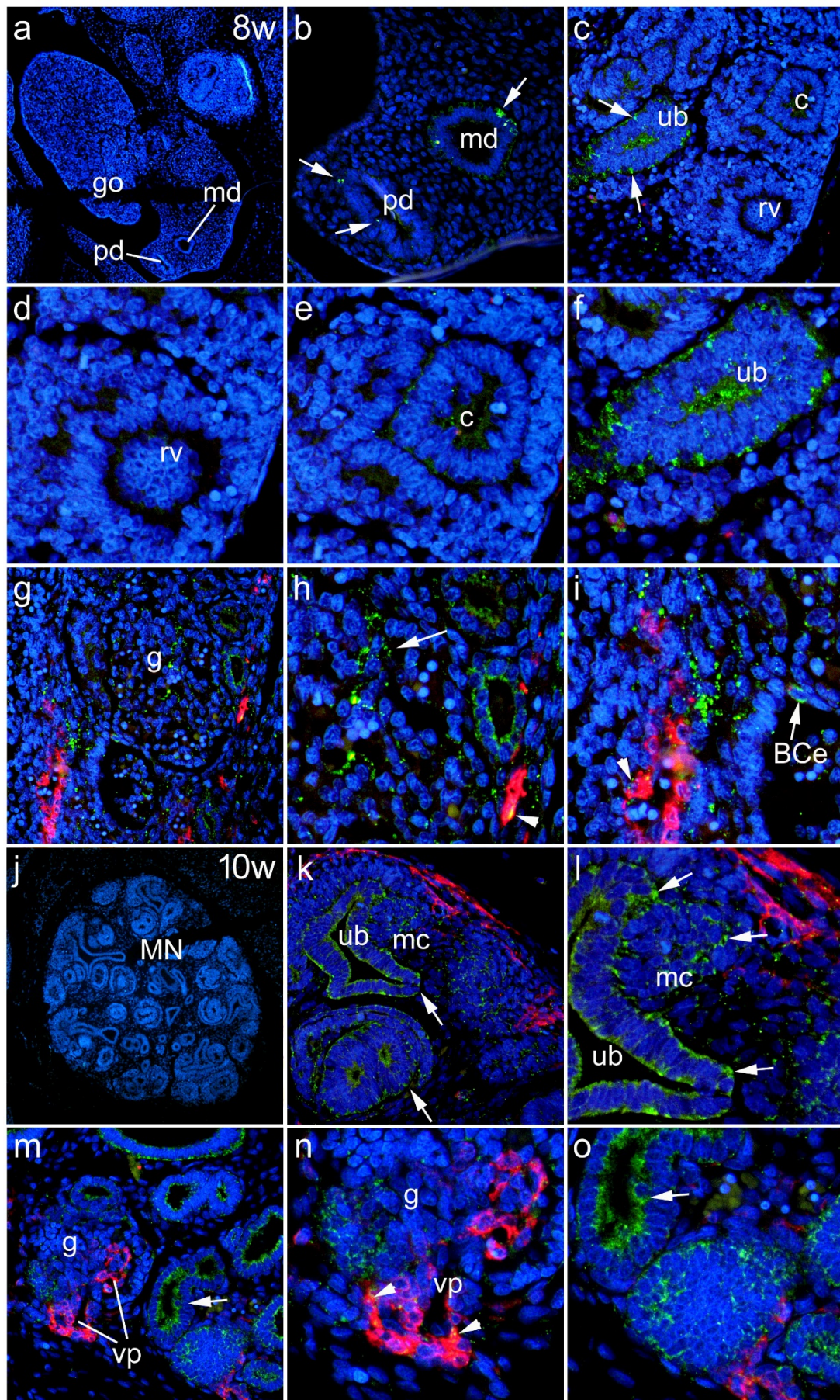
**Slika 9.** Ekspresija Panx1 tijekom 6. do 7. tjedna razvoja ljudskih bubrega. Tijekom 6. tjedna razvoja u urogenitalnom naboru – ur (a) mogu se vidjeti mezonefričke strukture (glomeruli – g, mezonefrički tubuli – mt). Ekspresija Panx1 pronađena je u mezonefričkim

glomerulima – *g* i mezonefričkim tubulima – *mt* (strelice), dok su aSMA pozitivne stanice viđene u stijenkama krvnih žila unutar glomerula. Također, snažna Panx1 imunoreaktivnost pronađena je u paramezonefričkom kanalu (*pd*); povećanje panela a (b). Pojednosti o pozitivnosti Panx1 i aSMA (vrhovi strelica) mogu se vidjeti na povećanju panela b (c). Na prijelazu iz 6. u 7. embrionalni tjedan i mezonefričke strukture (glomeruli – *g*, mezonefrički tubuli – *mt*) i metanefričke (MN) strukture mogu se vidjeti u neposrednoj blizini (d). Jaka Panx1 imunoreaktivnost (strelice) pronađena je u mezonefričkim tubulima (*mt*) i mezonefričkom kanalu – *md*; povećanje panela d (e) i panela e (f). Panx1 pozitivne stanice (strelice) mogu se vidjeti u metanefričkom ureteralnom pupoljku (*ub*), ampulama (a) dok se aSMA-pozitivne stanice (strelica) vide u krvnim žilama - *bv* (g). Povećanje panela g (h). Povećanje ureteričkog pupoljka (*ub*) sa slike g (i). U 7. tjednu razvoja vide se metanefros i gonada (*go*) (j). Od metanefričkih struktura, opažena je snažna Panx1 imunoreaktivnost (strelice) u ureteričkom pupoljku u razvoju (*ub*), dok je metanefrička čašica (*mc*) bila negativna (k). Povećanje panela k (l).

### 5.1.2. Osmi do deseti tjedan razvoja

U 8. tjednu razvoja, paramezonefrički kanal i mezonefrički kanal mogu se vidjeti na lateralnoj strani gonade u razvoju (Slika 10a). Ekspresija Panx1 bila je prisutna i u paramezonefričkim i mezonefričkim kanalima (Slika 10b), iako u manjoj mjeri nego u ranijim razvojnim fazama (Slika 2b). Osim toga, ekspresija Panx1 također je pronađena u ureteričnom pupoljku metanefrosa (Slika 10c). Imunoreaktivnost Panx1 bila je rijetka u bubrežnom mjehuriću (Slika 10d), prisutna u nefronu u obliku zareza (Slika 10e) ali značajno niža u usporedbi s ureteričnim pupoljkom (Slika 10f).

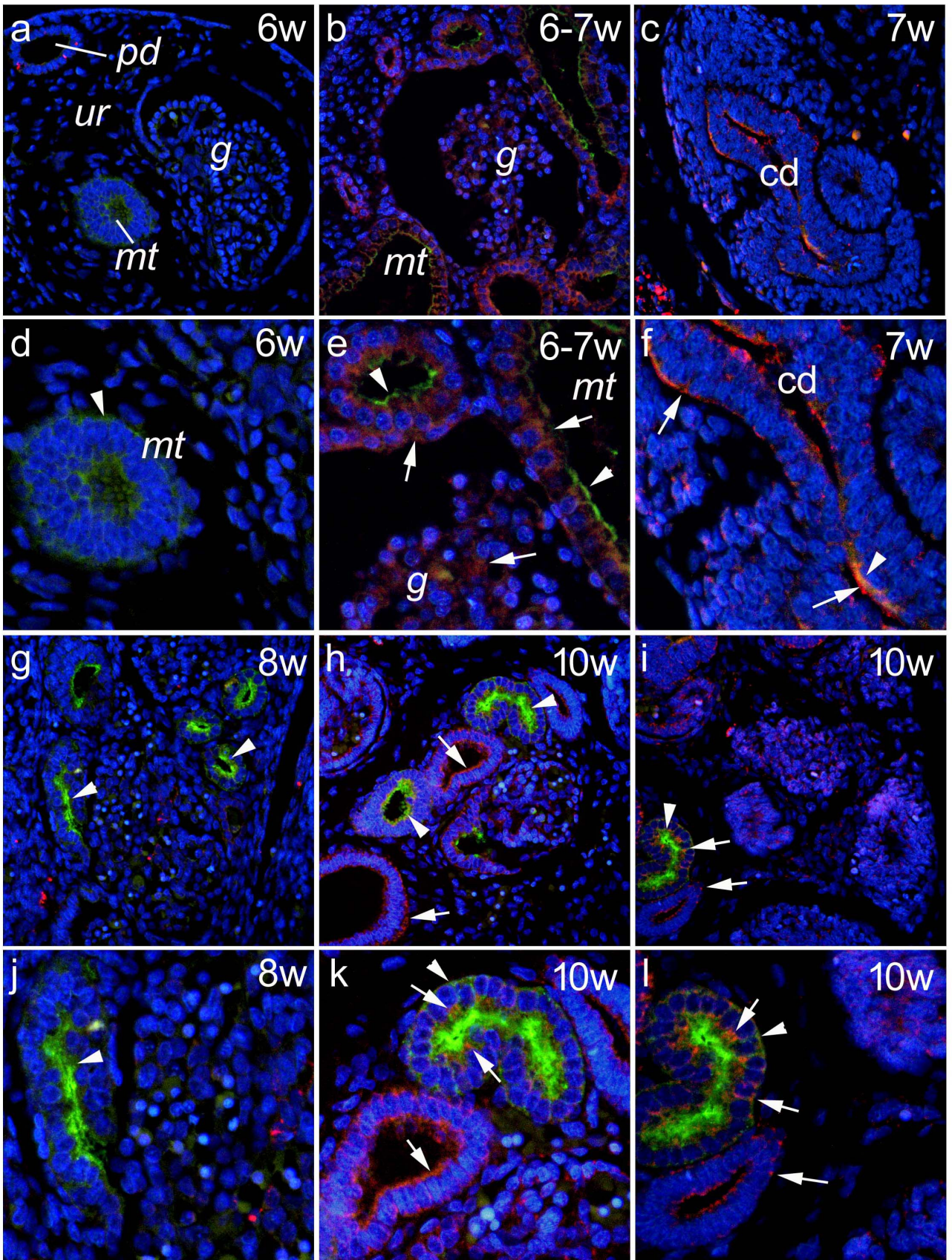
Panx1 imunoreaktivnost primijećena je u epitelnim stanicama Bowmanove kapsule. Osim toga, pronašli smo kolokalizaciju Panx1 s aSMA u krvnim žilama glomerularnog vaskularnog pola tijekom razvoja, kao i u ekstraglomerularnim krvnim žilama (Slika 10g-i). Tijekom 8. tjedna ekspresija Panx1 bila je izraženija u *Lotus tetragonolobus lektin* (LTL)-negativnim tubulima, a tijekom tog razdoblja bila je manja u LTL-pozitivnim tubulima (Slika 11). Tijekom ranog fetalnog razdoblja, u 10. tjednu razvoja, jaka imunoreaktivnost Panx1 nađena je u svim LTL-pozitivnim i -negativnim tubulima i u aSMA-imunoreaktivnim krvnim žilama vaskularnog glomerularnog pola i ekstraglomerularnim krvnim žilama (Slika 10k-o; Slika 10., 11).



**Slika 10.** Ekspresija Panx1 tijekom 8. do 10. tjedna razvoja ljudskog bubrega. U 8. razvojnom tjednu vidljivi su paramezonefrički kanal (pd) i mezonefrički kanal (md) na lateralnoj strani gonade u razvoju (go) (a). Ekspresija Panx1 bila je prisutna i u paramezonefričkom kanalu (pd) i u mezonefričkom kanalu (md) (b). Osim toga, ekspresija Panx1 također je pronađena u ureteričnom pupoljku (ub) metanefrosa (c). Imunoreaktivnost Panx1 nije bila prisutna u bubrežnom mjehuriću - rv (d), ali je nađena u nefronu u obliku zareza - c (e) i ureteričnom pupoljku (f). Panx1 imunoreaktivnost (strelice) uočena je u epitelnim stanicama Bowmanove kapsule - BCe, a također i kolokalizirana s aSMA (strelice) u krvnim žilama vaskularnog glomerularnog pola (vp) i u ekstraglomerularnim krvnim žilama u razvoju (g-i). U 10. tjednu razvoja (j), snažna Panx1 imunoreaktivnost nađena je u svim tubulima i u aSMA-imunoreaktivnim krvnim žilama vaskularnog glomerularnog pola i ekstraglomerularnim krvnim žilama (k-o); MN - metanefros; mc - metanefrična čašica; g - glomerul.

### **5.1.3. *Lotus tetragonolobus* lektin - vezanje tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja i njegova kolokalizacija s ekspresijom Panx1**

Slabo vezanje LTL-a, biljega za proksimalne tubule, uočeno je već u 6. tjednu razvoja mezonefričkih struktura u mezonefričkim tubulima (Slika 11a,d). Imunoreaktivnost Panx1 također je pronađena u paramezonefričkom kanalu (Slika 11a). U tjednima 6-7, vezanje LTL-a primijećeno je u mezonefričkim tubulima, gdje se kolokalizirao s Panx1, čija je ekspresija također pronađena u mezonefričkim glomerulima (Slika 11b,e). U 7. tjednu, Panx1 je bio snažno pozitivan u metanefričkim sabirnim kanalima, gdje je kolokalizirao s intenzivnom LTL imunofluorescencijom (Slika 11c,f). Jača i konzistentnija LTL imunofluorescencija pronađena je u kasnijim fazama (8. do 10. D.W.) i kolokalizirana je s ekspresijom Panx1 u 7. i 10. razvojnom tjednu (Slika 11g-l).



Slika 11. Vezanje *Lotus tetragonolobus* lektina (LTL) u bubregu tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja i njegova kolokalizacija s ekspresijom Panx1. Tijekom 6. tjedna



razvoja u urogenitalnom naboru - ur vide se mezonefričke strukture (glomeruli - *g*, mezonefrijski tubuli - *mt*); slabo vezanje LTL (zeleno; vrhovi strelica) uočeno je u *mt*; Panx1 (crveno) bio je pozitivan u paramezonefričkom kanalu (*pd*) (a). U 6-7. tjednu razvoja Panx1 je eksprimiran u mezonefričkim glomerulima - *g* i mezonefričkim tubulima - *mt* (strelice), dok je vezanje LTL (vrhovi strelica) opaženo u *mt* (b). U 7. tjednu u metanefrosu Panx1 bio je snažno pozitivan u sabirnim kanalićima (*cd*). Povećanje panela a (d). Povećanje panela b (e). Povećanje panela c (f). Jača i konzistentnija LTL imunofluorescencija pronađena je u kasnijim stadijima (8.-10. razvojni tjedan) - vrhovi strelica - i kolokalizirana je s ekspresijom Panx1 u 7. i 10. tjednu razvoja - strelice (*g-i*). Povećanje panela g (j). Povećanje panela h (k). Povećanje panela i (l).

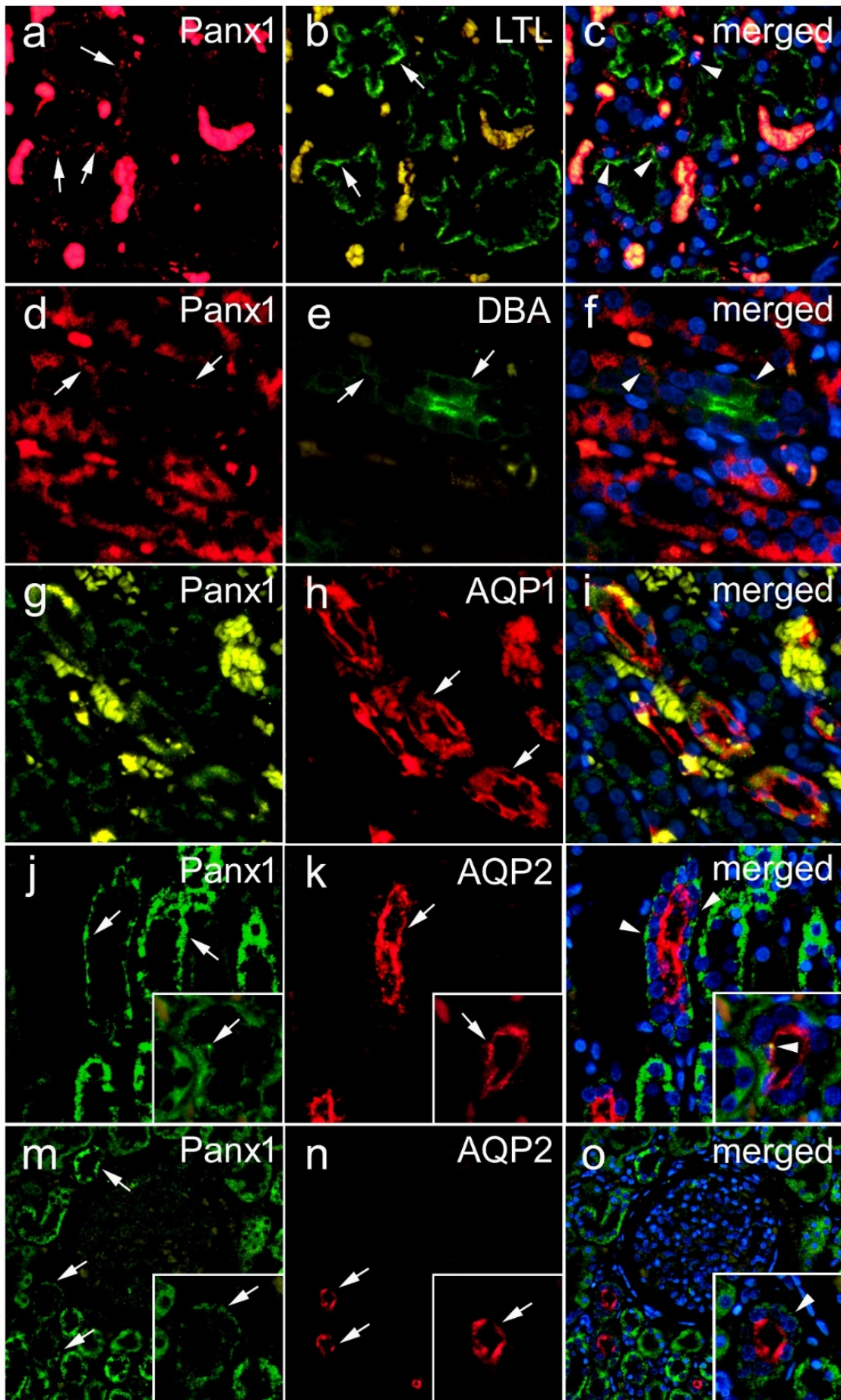
## 5.2. Bubrežna ekspresija Panx1 u postnatalnom ljudskom bubregu

U bubrežnom korteksu najintenzivnija Panx1 imunoreaktivnost primijećena je u tubularnim strukturama. Iako manje gustoće, Panx1 imunoreaktivne točkice također su videne u glomerulima. U različitim dijelovima bubrežne srži, intenzitet imunoreaktivnosti Panx1 varirao je od vrlo jake do slabe ovisno o vrsti tubularnih struktura, a činilo se da je nema u mišićnom sloju krvnih žila. Studijom dvostruke imunohistokemije potvrdili smo postojanje ekspresije Panx1 u različitim populacijama bubrežnih stanica u postnatalnom ljudskom bubregu (Slike 12 i 13).

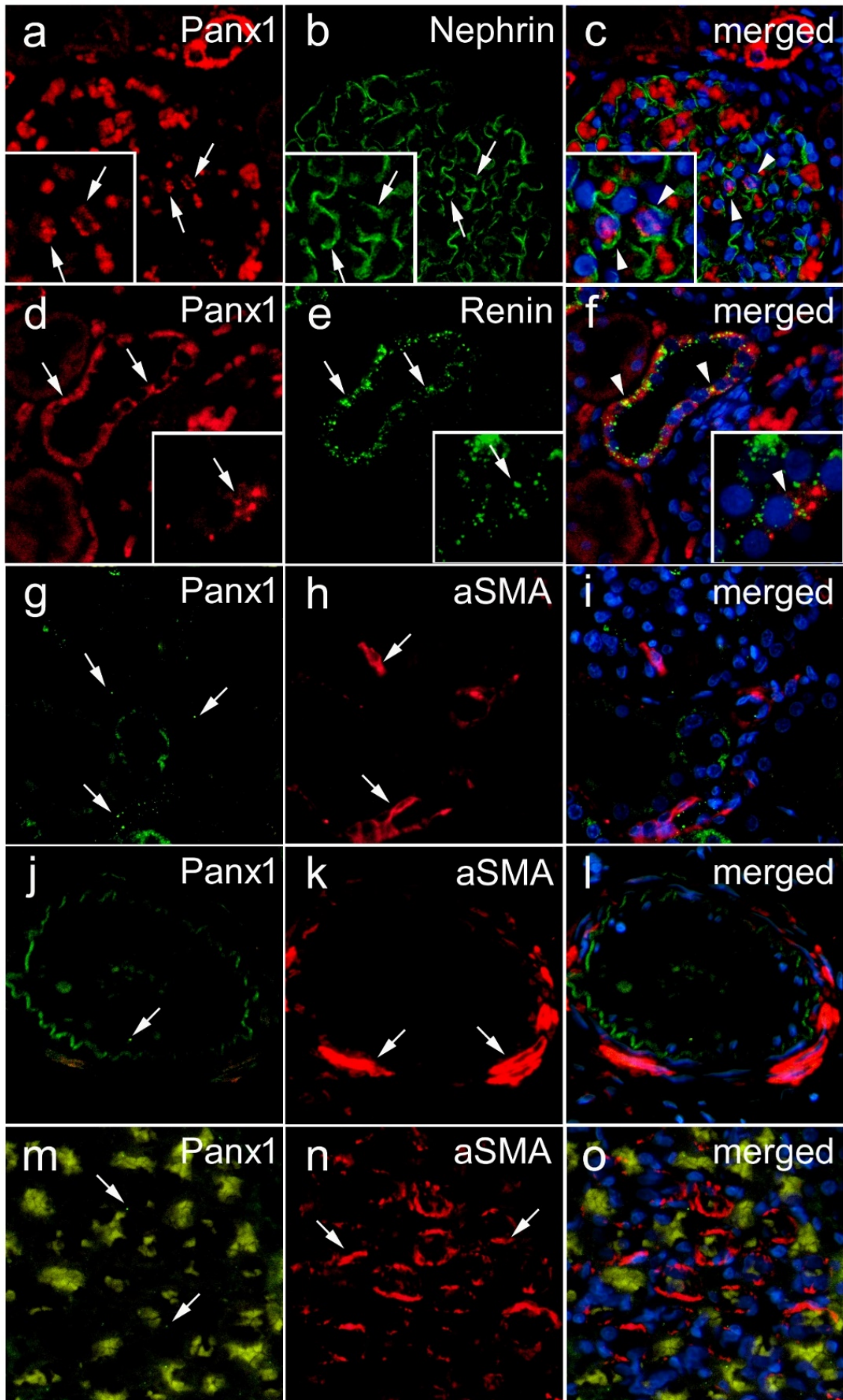
Kolokalizacija s LTL vezanjem otkrila je ekspresiju Panx1 u proksimalnim tubulima ljudskog bubrega (Slika 12a-c). Iako slaba, Panx1 imunoreaktivnost također je pronađena u određenim stanicama distalnih tubula, kao što je prikazano kolokalizacijom s vezivanjem DBA (Slika 12d-f). Osim toga, dvostruka imunohistokemija s akvaporinom 1 (AQP1) otkrila je ekspresiju Panx1 u silaznim tankim krakovima Henleove petlje (Slika 12g-i). Međutim, najintenzivnija ekspresija Panx1 u meduli pronađena je u stanicama sabirnih kanalića, što je prikazano kolokalizacijom s imunoreaktivnošću akvaporina 2 (AQP2) (Slika 12j-l). Osim toga, Panx1 imunoreaktivnost kolokalizirana s AQP2 također je pronađena u kortikalnim sabirnim kanalima (Slika 12m-o).

U postnatalnim glomerulima pronašli smo Panx1 imunoreaktivnost u podocitima koji su imunoreaktivni na nefrin (Slika 13a-c), iako je ista bila mnogo manje izražena u usporedbi s ekspresijom u tubularnim strukturama. Osim toga, pronašli smo snažnu ekspresiju Panx1 u

stanicama imunoreaktivnim na renin (Slika 13d-f). Međutim, za razliku od embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja, nismo pronašli ko-lokalizaciju između Panx1 i aSMA imunoreaktivnosti u postnatalnom ljudskom bubregu, ni u kortikalnim krvnim žilama u vaskularnom glomerularnom polu (Slika 13g-i), ni u velikim arterijama (Slika 13j-l), ni u medularnim krvnim žilama (Slika 13m-o). Umjesto toga, Panx1 imunoreaktivnost ponekad je bila prisutna u endotelu (Slika 13g-o).



**Slika 12. Ekspresija Panx1 u različitim tubularnim segmentima postnatalnog ljudskog bubrega.** Dvostruka imunohistokemija korištena je za lokalizaciju ekspresije Panx1 u različitim segmentima nefrona. Lijevi panel - Panx1 (a,d,g,j,m). Srednji panel - biljezi tubularnih segmenata (b,e,h,k,n): LTL - *Lotus tetragonolobus* lektin, biljeg za proksimalne tubule (b); DBA - *Dolichus biflorus* aglutinin, biljeg za distalne tubule (e); AQP1 - Aquaporin 1, biljeg za stanice tankog silaznog kraka Henlyjeve petlje (h); AQP2 - Aquaporin 2, biljeg za sabirne kanaliće (u meduli i kortikalnim sabirnim kanalićima) (k,n). Desni panel - oboje (Panx1 i specifični biljeg) preklapljeno s nuklearnim DAPI bojanjem (c,f,i,l,o). Strelica - pozitivna imunoekspresija; vrhovi strelica – ko-lokalizacija.



**Slika 13. Glomerularna i vaskularna ekspresija Panx1 u postnatalnom ljudskom bubregu.** Dvostruka imunohistokemija korištena je za lokalizaciju ekspresije Panx1 u podocitima, stanicama koje proizvode renin i vaskularnim glatkim mišićnim stanicama. Lijevi panel - Panx1 (a,d,g,j,m). Nefrin - biljeg za podocite; aSMA - alfa glatki aktin, biljeg za glatke mišićne stanice krvnih žila (ovdje u stjenci žile). Srednji panel - specifični biljezi za podocite, stanice koje proizvode renin ili glatke mišićne stanice (b,e,h,k,n). Desni panel - oboje (Panx1 i specifični biljeg) preklapljeno s nuklearnim DAPI bojanjem (c,f,i,l,o). Strelica - pozitivna imunoekspresija; vrhovi strelica – ko-lokalizacija.

### 5.3. Ekspresija Panx1 u dijabetičkim i nedijabetičkim uzorcima bubrega

Analizirani su uzorci bubrega 41 bolesnika (29 muškaraca i 12 žena) (Tablica 2). Kod njih 21 potvrđen je dijabetes tipa 2, dok ih 20 nisu bili dijabetičari. Prosječna dob bolesnika bila je  $66,7 \pm 9,3$  godine (44-89). Kreatinin u serumu prije operacije bio je  $103,4 \pm 42,2$   $\mu\text{mol/l}$  (50-250  $\mu\text{mol/l}$ ). U skupini dijabetičara bilo je 13 muškaraca i 8 žena; srednja dob bila je  $68,6 \pm 9,9$  godina (49-89) sa serumskim kreatininom od  $107,3 \pm 54,2$   $\mu\text{mol/l}$  (61-250  $\mu\text{mol/l}$ ). U skupini bez dijabetesa bilo je 14 muškaraca i 5 žena, prosječna dob bila je  $64,4 \pm 8,8$  godina (44-75), a srednja prijeoperacijska vrijednost kreatinina u serumu bila je  $99,6 \pm 27,8$   $\mu\text{mol/l}$  (50-164  $\mu\text{mol/l}$ ). Nismo pronašli statistički značajnu razliku u serumskom kreatininu ( $p=0,66$ ) ili dobi ( $p=0,202$ ) između skupina.

**Tablica 2.** Dob, spol, kreatinin u serumu i ekspresija Panx1 u glomerulima i tubulima

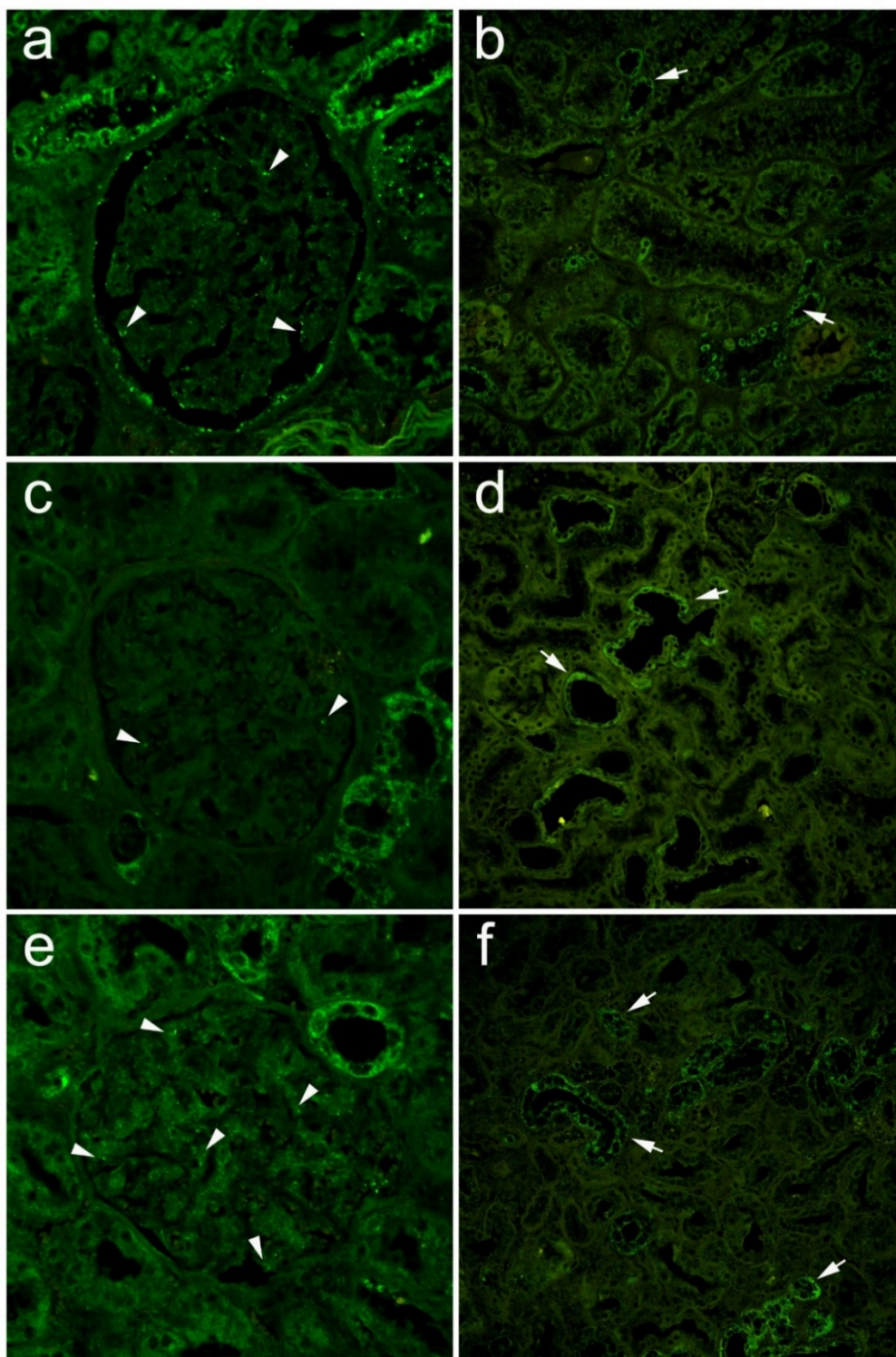
|                | N<br>Muškarci | N<br>Žene | Dob<br>(godine)            | Kreatinin<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | Panx 1<br>%<br>površine<br>glomerula | Panx 1<br>% površine<br>tubulointercicija |
|----------------|---------------|-----------|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Svi            | 29            | 12        | $66,7 \pm 9,43$<br>(44-89) | $103,4 \pm 42,2$<br>(50-250)       | $8,53 \pm 6,89$<br>(1,94-<br>41,33)  | $2,67 \pm 1,16$<br>(0,85-1,13)            |
| Nedijabetičari | 16            | 4         | $64,4 \pm 8,8$<br>(44-75)  | $99,6 \pm 27,8$<br>(50-164)        | $7,57 \pm 5,13$<br>(2,01-<br>34,2)   | $2,5 \pm 0,99$<br>(0,85-8,13)             |
| Dijabetičari   | 13            | 8         | $68,6 \pm 9,9$<br>(49-89)  | $107,3 \pm 54,2$<br>(61-250)       | $9,45 \pm 8,13$<br>(1,94-<br>41,33)  | $2,82 \pm 1,3$<br>(0,9-6,54)              |

Analizirano je 410 glomerula (210 dijabetičara i 200 nedijabetičara) (Slika 14). Ekspresija Panx1 bila je viša u glomerulima ( $9,45 \pm 8,13\%$  naspram  $7,57 \pm 5,13\%$ ) i tubulointersticiju ( $2,82 \pm 1,3\%$  naspram  $2,5 \pm 0,99\%$ ) dijabetičara, ali bez statističke značajnosti ( $p=0,828$  i  $p=0,056$ , odnosno) (Tablica 2). Pronašli smo statistički značajnu pozitivnu korelaciju između ekspresije Panx1 u glomerulima i kreatinina u serumu ( $\rho=0,162$ ,  $p=0,002$ ) te ekspresije Panx1 i dobi bolesnika ( $\rho=0,151$ ,  $p=0,003$ ) (Tablica 3). U podskupini bolesnika sa šećernom bolešću ta korelacija s kreatininom ( $\rho=0,265$ ,  $p<0,001$ ) i dobi ( $\rho=0,227$ ,  $p<0,001$ ) bila je još izraženija. U bolesnika bez dijabetesa nije bilo statistički značajne korelacije između ekspresije Panx1 u glomerulima i kreatinina u serumu ( $p=0,914$ ) niti s dobi ( $p=0,384$ ).

S druge strane, nismo pronašli statistički značajnu korelaciju između tubularne/intersticijske ekspresije Panx1 i kreatinina u serumu ( $p=0,543$ ), ali je postojala statistički značajna pozitivna korelacija između tubularne/intersticijske ekspresije Panx1 i dobi ( $\rho=0,105$ ,  $p=0,044$ ). U podskupini bolesnika sa šećernom bolešću nije nađena korelacija s kreatininom ( $p=0,963$ ), ali je postojala statistički još izraženija značajna pozitivna korelacija s dobi ( $\rho=0,162$ ,  $p=0,003$ ). U bolesnika bez dijabetesa nismo pronašli statistički značajnu korelaciju između tubularno/intersticijske ekspresije Panx1 i kreatinina u serumu ( $p=0,344$ ) ili s dobi ( $p=0,089$ ).

**Tablica 3.** Spearmanov koeficijent korelacije ekspresije Panx1 u glomerulima i tubulima s dobi bolesnika i kreatininom u serumu.

|                |                  | Panx 1<br>% površine<br>glomerula | Panx 1<br>% površine<br>tubulointersticij |
|----------------|------------------|-----------------------------------|---|
| Svi            | <b>Dob</b>       | 0,151<br><b>p = 0,003</b>         | 0,105<br><b>p = 0,044</b>                 |
|                | <b>Kreatinin</b> | 0,162<br><b>p = 0,002</b>         | -0,033<br>p = 0,543                       |
| Nedijabetičari | <b>Dob</b>       | 0,065<br>p = 0,384                | 0,089<br>p = 0,249                        |
|                | <b>Kreatinin</b> | 0,008<br>p = 0,914                | -0,071<br>p = 0,344                       |
| Dijabetičari   | <b>Dob</b>       | 0,227<br><b>p &lt; 0,001</b>      | 0,213<br><b>p = 0,003</b>                 |
|                | <b>Kreatinin</b> | 0,265<br><b>P &lt; 0,001</b>      | 0,004<br>p = 0,963                        |



**Slika 14. Ekspresija paneksina 1 u glomerulima i tubulima dijabetičara i bolesnika bez dijabetesa.** Bubrežni rezovi obojeni su imunohistokemijski pomoću anti-Panx1 – antitijela (zeleno). a) glomerul bolesnika bez dijabetesa s normalnim kreatininom; b) tubuli istog bolesnika; c) glomerul dijabetičara s normalnim kreatininom; d) tubuli istog bolesnika e) glomeruli dijabetičara s povišenim kreatininom; f) tubuli istog bolesnika. Vrhovi strelica – ekspresija Panx1 u glomerulima; strelice – izražaj Panx1 u tubulima.



## **6. RASPRAVA**

Međustanična komunikacija putem tijesnih spojeva i parakrinih ATP signalnih putova igra važnu ulogu u normalnoj morfogenezi i funkciji različitih organskih sustava (70-72). Unatoč intenzivnim istraživanjima uloge međustanične komunikacije preko koneksinskih kanala u razvoju bubrega, nema podataka o ekspresiji i ulozi paneksina u embrionalnom i fetalnom razvoju, posebice u ljudskom embriju. Prethodne studije pokazale su da prostorno-vremenska promjena u ekspresiji stanične proliferacije i biljega apoptoze, nekih intermedijarnih filamenata i faktora rasta tijekom normalnog razvoja bubrega ovisi o stadiju (bubrežni mjehurić, tjelešce u obliku slova S, stadij kapilarne petlje, bubrežno tjelešce) (73-76). Stoga je cilj ove studije bio istražiti prostorno-vremensku ekspresiju Panx1 u ljudskom bubregu tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja.

Tijekom 6. tjedna embrionalnog razvoja pronašli smo ekspresiju Panx1 u mezonefričkim glomerulima i mezonefričkim tubulima. Na prijelazu iz 6. u 7. tjedan embrionalnog razvoja utvrđena je snažna Panx1 imunoreaktivnost u mezonefričkim tubulima i mezonefričkom kanalu. Osim toga, Panx1 imunoreaktivne stanice mogle su se vidjeti u metanefričkom pupoljku uretera i ampulama.

U 7. tjednu razvoja u metanefrosu, opažena je snažna Panx1 imunoreaktivnost u mokraćovodnom pupoljku u razvoju, dok u metanefričkoj kapi Panx1 imunoreaktivnost nije pronađena. Prisutnost Panx1 u mokraćovodnom pupoljku, koji potječe iz mezonefričkog kanala, sugerira da bi mokraćovodni pupoljak također mogao koristiti purinergičke signale za induciranje metanefrogenog mezenhima na nefrogenozu (formiranje metanefričkog mjehurića). U prilog ovoj teoriji, Hillman i suradnici (77) otkrili su u mišjim bubrezima u razvoju da je jedan od purinergičkih signalnih receptora - P2X7 - izražen na dan E13 u kondenzirajućem mezenhimu uz ureteralni pupoljak, dok grane ureteralnog pupoljka, tjelešca u obliku slova S, primitivni glomeruli i proksimalni tubuli nisu ispoljavali P2X7, što ukazuje da je kondenzirajući mezenhim metanefričke čašice sposoban odgovoriti na purinergičke signale.

U 8. tjednu razvoja, ekspresija Panx1 je također pronađena u mokraćovodnom pupoljku u metanefrosu, kao i u bubrežnom mjehuriću i nefronu u obliku zareza. Osim toga, imunoreaktivnost Panx1 primijećena je u epitelnim stanicama Bowmanove kapsule. U skladu s prethodnim nalazima, moglo bi se sugerirati da bi purinergičko signaliziranje u pupoljku uretera moglo biti važno za epitelno-mezenhimsku transformaciju tijekom indukcije bubrežnih vezikula. Kasnije, kada se dosegne epitelni fenotip stanica metanefričkih tubula, one također počinju ispoljavati Panx1 i potencijalno mogu doprinijeti purinergičkoj signalizaciji.

Ekspresija Panx1 koju smo pronašli u ranoj fazi i u paramezonefričkom i mezonefričkom kanalu, a koja se smanjivala prema 8. razvojnom tjednu, može ukazivati na važnost Panx1 u ranom razvoju paramezonefričkog i mezonefričkog duktusa, koja se smanjuje prema 8. tjednu razvoja.

Rana pojava LTL vezanja koju smo pronašli u metanefričkim tubulima i postupno povećanje intenziteta fluorescencije s razvojnom dobi ukazuju na rano opredjeljenje tubularnih stanica ka postizanju fenotipa specifičnog tubularnog segmenta. Međutim, iz rezultata dvostrukog bojanja LTL-Panx1 zaključili smo da ekspresija Panx1 tijekom ranog embrionalnog razvoja bubrega nije bila ograničena na određeni tubularni segment.

Tijekom 6. tjedna aSMA-pozitivne stanice već su viđene u stjenkama krvnih žila unutar glomerula, a Panx1 imunofluorescencija bila je prisutna u aSMA-imunoreaktivnim stanicama. U 8. tjednu razvoja, kolokalizacija Panx1 s aSMA pronađena je u krvnim žilama vaskularnog glomerularnog pola, kao i u ekstraglomerularnim krvnim žilama, a još je više naglašena tijekom ranog fetalnog razdoblja, u 10. tjednu razvoja. Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu Panx1 u razvoju vaskularnih struktura glomerularnog vaskularnog pola i ekstraglomerularnih bubrežnih krvnih žila tijekom ranog fetalnog razvoja.

Stanična lokalizacija Panx1 u ljudskom bubregu nije poznata i istraživanja na bubrezima glodavaca također su rijetka (63, 66). Stoga smo u ovoj studiji upotrijebili dvostruku imunohistokemijsku tehniku za određivanje lokalizacije Panx1 u različitim staničnim populacijama ljudskog bubrega. U postnatalnom ljudskom bubregu pronašli smo najintenzivniju Panx1 imunoreaktivnost u tubularnim strukturama bubrežnog korteksa. Iako manje gustoće, Panx1 imunoreaktivne točkice također su viđene u glomerulima. U različitim dijelovima bubrežne srži, intenzitet Panx1 imunofluorescencije varirao je od vrlo jake do slabe, ovisno o vrsti tubularne strukture, a naizgled nije pronađena u mišićnom sloju krvnih žila.

Studija dvostruke imunohistokemije i ko-lokalizacije sa specifičnim biljezima omogućila nam je da potvrdimo postojanje ekspresije Panx1 u različitim populacijama bubrežnih stanica u postnatalnom ljudskom bubregu. Najintenzivnija Panx1 imunoreaktivnost bila je prisutna u stanicama sabirnih kanalića u meduli i u kortikalnim sabirnim kanalićima. Kolokalizacija s LTL vezanjem otkrila je ekspresiju Panx1 u proksimalnim tubulima ljudskog bubrega. Vrlo slaba Panx1 imunoreaktivnost također je pronađena u određenim stanicama distalnih tubula (DBA-imunoreaktivne) i u silaznim tankim krakovima Henleove petlje (AQP1-imunoreaktivne stanice). Ovi se nalazi djelomično slažu s rezultatima studije na miševima (13) gdje je jaka Panx1 imunoreaktivnost nađena u segmentima kortikalnih i medularnih tubula. Konkretno, Panx1 je otkriven u proksimalnom tubulu, tankom silaznom segmentu Henleove

petlje i sustavu sabirnih kanala bubrega miševa. Glavna razlika između naše studije na ljudskim bubrezima i rezultata Hannerer i suradnika (13) na mišjem bubregu je da smo pronašli samo rijetku Panx1 imunoreaktivnost u tankom silaznom kraku Henleove petlje, prema ko-lokalizaciji s biljekom AQP1. Prisutnost Panx1 u tubularnom epitelu vjerojatno je povezana s otpuštanjem ATP-a u tubularni lumen, za koji se ranije pokazalo da je ovisan o Panx1 u miševa, a sugerirano je da bi Panx1 mogao biti uključen u kontrolu transporta tekućine i elektrolita preko bubrežnog epitela (13, 63).

Imunoreaktivnost Panx1 također je pronađena u podocitima (obilježenih nefrinom). Naše otkriće Panx1 u glomerulima i njegova prisutnost u podocitima postnatalnog ljudskog bubrega je u skladu su s prethodnim rezultatima Lia i suradnika (64), koji je pronašao obilnu ekspresiju Panx1 u uzgojenim i nativnim mišjim podocitima. Njihova studija je otkrila da Panx1 kanali mogu posredovati u provođenju aniona kroz staničnu membranu podocita, omogućujući transport ATP-a.

Jaka Panx1 imunoreaktivnost koju smo pronašli u stanicama obilježenim reninom u skladu je s prethodnim nalazima i podupire važnu ulogu Panx1 u međustaničnoj komunikaciji granularnih stanica tijekom regulacije krvnog tlaka (65). Međutim, nedostatak bilo kakve ko-lokalizacije između Panx1 i aSMA imunoreaktivnosti u vaskulaturi postnatalnog ljudskog bubrega, za razliku od onoga što smo pronašli u embrionalnom i ranom fetalnom razdoblju, nije u skladu s nalazima u mišjim bubrezima (13), gdje je snažna Panx1 imunoreaktivnost pronađena u aSMA-pozitivnim vaskularnim glatkim mišićnim stanicama. To može ukazivati na varijabilnost vrsta i važniju ulogu Panx1 u komunikaciji stanica glatkih mišića tijekom intarauterinog razvoja kod ljudi. Imunoreaktivnost Panx1 koju smo pronašli u endotelu u skladu je s prethodnim nalazima (62) u mišjoj arterijskoj mreži i podupire važnu ulogu Panx1 u međustaničnoj komunikaciji vaskularnih endotelnih stanica. Doista, Lohman i suradnici (62) otkrili su da je Panx1 jedini Panx koji se dosljedno izražava u endotelu u cijelom arterijskom stablu bez obzira na veličinu arterije. Također su otkrili da je ekspresija Panx1 u glatkim mišićnim stanicama jedva vidljiva u većim provodnim arterijama, ali su pokazali određenu ekspresiju Panx1 u glatkim mišićnim stanicama u bubrežnim arterijama i velikim i malim koronarnim arterijama. Međutim, u navedenoj studiji nije provedena ko-lokalizacija s aSMA, markerom glatkih mišićnih stanica, što je moglo dovesti do nešto drugačije interpretacije rezultata u usporedbi s našom studijom.

Kronična bubrežna bolest kao glavni uzrok zatajenja bubrega, često posljedica DN, globalni je zdravstveni problem, koji zahtijeva nove dijagnostičke i terapijske pristupe temeljene na boljem poznavanju patofizioloških mehanizama. Sve veći broj studija ukazuje na

izravnu međustaničnu komunikaciju i ulogu parakrinog ATP-a u patofiziologiji DN (37-41, 78). Unatoč opsežnim studijama o ulozi purinergičke signalizacije u različitim bubrežnim patologijama (79), uloga Panx1, jednog od glavnih kanala koji pridonose izvanstaničnom oslobađanju, nije istražena u ovim procesima.

U našem smo istraživanju pronašli značajnu pozitivnu korelaciju između ekspresije Panx1 u glomerulima i kreatinina u serumu, koja je bila još izraženija u podskupini bolesnika s dijabetesom, a nije pronađena u skupini bez dijabetesa. Ova korelacija glomerularne ekspresije Panx1 s ozbiljnošću oštećenja bubrega također se može objasniti zaključcima ranije spomenute studije, prema kojoj fiziološka inhibicija aktivnosti Panx1 kanala može biti oslabljena u patološkim uvjetima, na primjer, kod pretilosti zbog hipoadiponektinemije (64). Pod takvim uvjetima, povećana aktivnost Panx1 može dovesti do oslobađanja ATP-a, aktivacije inflamasona i posljedičnog upalnog odgovora (52). Uloga Panx1-kanala u bubrežnoj patologiji također je podržana otkrićima da farmakološka inhibicija Panx1 karbenoksolonom, kao i genetska delecija Panx1, umanjuje ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu bubrega u miševa (63). U istoj studiji, utvrđeno je da genetska delecija Panx1 u proksimalnim tubulima ili vaskularnim endotelnim stanicama štiti miševe od bubrežne ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Međutim, gore spomenuta studija nije istraživala utjecaj delecije Panx1 na druge populacije bubrežnih stanica, uključujući podocyte ili mezangijske stanice (63, 66). Autori su predložili Panx1 kao potencijalnu farmakološku metu u AOB i predložili nekoliko mehanizama renoprotektivnog učinka u miševa s nedostatkom Panx1, uključujući smanjenu upalu sa smanjenom ekspresijom citokina i adhezijskih molekula te smanjenom infiltracijom neutrofilima (63).

Za razliku od AOB, kod koje oštećenje bubrega uglavnom potječe iz proksimalnih tubula, patološki procesi kod KBB obično počinju u glomerulima. Dijabetička nefropatija, jedan od glavnih uzroka KBB, obično počinje glomerularnom hiperfiltracijom i hipertrofijom i nastavlja se kao upala u tubulo-intersticijskom odjeljku. Štoviše, nakupljanje proteina izvanstaničnog matriksa dovodi do progresivne glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze (80, 81). Međutim, AOB je jedna od dijabetičkih komplikacija i može dovesti do KBB ako se ne liječi (66). Rezultati naše studije nisu pokazali razliku u ekspresiji Panx1 u glomerulima ili tubulo-intersticijskom odjeljku između dijabetičara i kontrolne skupine pacijenata. Međutim, korelacija između ozbiljnosti bubrežne ozljede, mjerene kreatininom u serumu, i ekspresije glomerularnog Panx1 koju smo uočili u skupini pacijenata s dijabetesom ukazuje na prognostičku vrijednost ekspresije glomerularnog Panx1 i potencijal farmakološke modulacije Panx1 u liječenju DN inducirane KBB. Iako je poznato da nekoliko farmakoloških sredstava koje je FDA već odobrila za druge bolesti inhibiraju Panx1-kanale (66) potrebna su daljnja

istraživanja kako bi se pronašli selektivniji inhibitori Panx1 i istražilo može li inhibicija Panx1 smanjiti oštećenje bubrega kod kronične bubrežne bolesti i njihov potencijal za liječenje kronične bubrežne bolesti.

## **7. ZAKLJUČCI**

Prostorno-vremenska ekspresija Panx1 tijekom ranih faza razvoja ljudskog bubrega podržava njegovu moguću ulogu u procesima stanične diferencijacije, migracije i pozicioniranja u razvoju ljudskog bubrega. Prisutnost Panx1 u mokraćovodnom pupoljku, koji potječe iz mezonefričkog kanala, sugerira da bi mokraćovodni pupoljak također mogao koristiti purinergičke signale za induciranje metanefrogenog mezenhima na nefrogenezu (formiranje metanefričkog mjehurića). U skladu s prethodnim nalazima, moglo bi se sugerirati da bi purinergičko signaliziranje u pupoljku uretera moglo biti važno za epitelno-mezenhimsku transformaciju tijekom indukcije bubrežnih vezikula. Kasnije, kada se dosegne epitelni fenotip stanica metanefričkih tubula, one također počinju ispoljavati Panx1 i potencijalno mogu doprinijeti purinergičkoj signalizaciji.

Rana pojava LTL vezanja koju smo pronašli u metanefričkim tubulima i postupno povećanje intenziteta fluorescencije s razvojnom dobi ukazuju na rano opredjeljenje tubularnih stanica ka postizanju fenotipa specifičnog tubularnog segmenta. Ekspresija Panx1 tijekom ranog embrionalnog razvoja bubrega nije ograničena na određeni tubularni segment.

Naši rezultati ukazuju na važnu ulogu Panx1 u razvoju vaskularnih struktura glomerularnog vaskularnog pola i ekstraglomerularnih bubrežnih krvnim žila tijekom ranog fetalnog razvoja. Nedostatak bilo kakve ko-lokalizacije između Panx1 i aSMA imunoreaktivnosti u vaskulaturi postnatalnog ljudskog bubrega, za razliku od onoga što smo pronašli u embrionalnom i ranom fetalnom razdoblju, nije u skladu s nalazima u mišjim bubrezima što može ukazivati na varijabilnost vrsta i važniju ulogu Panx1 u komunikaciji stanica glatkih mišića tijekom intarauterino razvoja kod ljudi. Imunoreaktivnost Panx1 koju smo pronašli u endotelu u skladu je s prethodnim nalazima u mišjoj arterijskoj mreži i podupire važnu ulogu Panx1 u međustaničnoj komunikaciji vaskularnih endotelnih stanica.

Izražaj Panx1 u različitim populacijama stanica postnatalnog bubrega čovjeka ukazuje na njegov značaj u normalnoj funkciji tih stanica.

Korelacija između ozbiljnosti bubrežne ozljede, mjerene kreatininom u serumu, i ekspresije glomerularnog Panx1 koju smo uočili u skupini pacijenata s dijabetesom ukazuje na prognostičku vrijednost ekspresije glomerularnog Panx1 i potencijal farmakološke modulacije Panx1 u liječenju DN inducirane KBB.



## **8. LITERATURA**

1. Betts JG. *Anatomy and Physiology*: OpenStax College, Rice University; 2013. Slobodan pristup na: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>
2. Harper S, Unwin R. 4717C21.1 Structure and function of the kidney. In: Firth JD, Firth J, Conlon C, Cox T, editors. *Oxford Textbook of Medicine*: Oxford University Press; 2020. p. 0.
3. Saraga-Babić MP, L; Mardešić, S; Kostić, S; Sapunar, D. *Embriologija i histologija čovjeka*. Split: Sveučilište u Splitu; 2014.
4. Arthur C. Guyton JEH. *Medicinska fiziologija*. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
5. Stevens LA, Zhang Y, Schmid CH. Evaluating the performance of equations for estimating glomerular filtration rate. *J Nephrol*. 2008;21(6):797-807.
6. Lamon S, Russell AP. The role and regulation of erythropoietin (EPO) and its receptor in skeletal muscle: how much do we really know? *Front Physiol*. 2013;4:176.
7. Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol*. 2017;30(2):125-33.
8. Reidy KJ, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol*. 2009;29(4):321-37.
9. Sadler TW. *Langmanova medicinska embriologija* Zagreb: Školska knjiga; 2009.
10. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* 2020.
11. Sorokin L, Ekblom P. Development of tubular and glomerular cells of the kidney. *Kidney Int*. 1992;41(3):657-64.
12. Nagata M, Nakayama K, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T. Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. *Am J Pathol*. 1998;153(5):1511-20.
13. Hanner F, Lam L, Nguyen MT, Yu A, Peti-Peterdi J. Intrarenal localization of the plasma membrane ATP channel pannexin1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(10):F1454-9.
14. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Vukojevic K, Saraga M, Glavina Durdov M, et al. Spatio-temporal patterning of different connexins in developing and postnatal human kidneys and in nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF). *Sci Rep*. 2020;10(1):8756.
15. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Bocina I, Glavina Durdov M, Vukojevic K, et al. Connexin Signaling in the Juxtaglomerular Apparatus (JGA) of Developing, Postnatal Healthy and Nephrotic Human Kidneys. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).

16. Group KDIGO. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3:1-150.
17. Charles C, Ferris AH. Chronic Kidney Disease. *Prim Care.* 2020;47(4):585-95.
18. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V. Chronic kidney disease. *Lancet.* 2021;398(10302):786-802.
19. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-52.
20. Hrvatsko društvo za nefrologiju dit. Hrvatski registar nadomještanja bubrežne funkcije - HRNBF  
[https://www.hdndt.org/system/hdndt/registry\\_reports/report\\_files/000/000/015/original/Registar\\_nadomjes%CC%8Ctanja\\_bubrez%CC%8Cne\\_funkcije-2017-2018.pdf?1614031896](https://www.hdndt.org/system/hdndt/registry_reports/report_files/000/000/015/original/Registar_nadomjes%CC%8Ctanja_bubrez%CC%8Cne_funkcije-2017-2018.pdf?1614031896)
21. Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes Obes Metab.* 2020;22 Suppl 1:3-15.
22. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 2018;71(6):884-95.
23. Thipsawat S. Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: A review of the literature. *Diab Vasc Dis Res.* 2021;18(6):14791641211058856.
24. Warren AM, Knudsen ST, Cooper ME. Diabetic nephropathy: an insight into molecular mechanisms and emerging therapies. *Expert Opin Ther Targets.* 2019;23(7):579-91.
25. Pelle MC, Provenzano M, Busutti M, Porcu CV, Zaffina I, Stanga L, et al. Up-Date on Diabetic Nephropathy. *Life (Basel).* 2022;12(8).
26. Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15).
27. Donate-Correa J, Luis-Rodriguez D, Martin-Nunez E, Tagua VG, Hernandez-Carballo C, Ferri C, et al. Inflammatory Targets in Diabetic Nephropathy. *J Clin Med.* 2020;9(2).
28. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 2008;57(6):1446-54.
29. Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1497449.
30. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension.* 2002;39(1):129-34.

31. Navarro JF, Mora C. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(12):2601-4.
32. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Garcia-Perez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(6):327-40.
33. Perez-Morales RE, Del Pino MD, Valdivielso JM, Ortiz A, Mora-Fernandez C, Navarro-Gonzalez JF. Inflammation in Diabetic Kidney Disease. *Nephron*. 2019;143(1):12-6.
34. Williams BM, Cliff CL, Lee K, Squires PE, Hills CE. The Role of the NLRP3 Inflammasome in Mediating Glomerular and Tubular Injury in Diabetic Nephropathy. *Front Physiol*. 2022;13:907504.
35. Shahzad K, Bock F, Dong W, Wang H, Kopf S, Kohli S, et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2015;87(1):74-84.
36. Alyaseer AAA, de Lima MHS, Braga TT. The Role of NLRP3 Inflammasome Activation in the Epithelial to Mesenchymal Transition Process During the Fibrosis. *Front Immunol*. 2020;11:883.
37. Price GW, Potter JA, Williams BM, Cliff CL, Wall MJ, Hills CE, et al. Examining Local Cell-to-Cell Signalling in the Kidney Using ATP Biosensing. *Methods Mol Biol*. 2021;2346:135-49.
38. Sun X, Huang K, Haiming X, Lin Z, Yang Y, Zhang M, et al. Connexin 43 prevents the progression of diabetic renal tubulointerstitial fibrosis by regulating the SIRT1-HIF-1 $\alpha$  signaling pathway. *Clin Sci (Lond)*. 2020;134(13):1573-92.
39. Price GW, Potter JA, Williams BM, Cliff CL, Squires PE, Hills CE. Connexin-mediated cell communication in the kidney: A potential therapeutic target for future intervention of diabetic kidney disease?: Joan Mott Prize Lecture. *Exp Physiol*. 2020;105(2):219-29.
40. Hills C, Price GW, Wall MJ, Kaufmann TJ, Chi-Wai Tang S, Yiu WH, et al. Transforming Growth Factor Beta 1 Drives a Switch in Connexin Mediated Cell-to-Cell Communication in Tubular Cells of the Diabetic Kidney. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(6):2369-88.
41. Chen Q, Tao J, Li G, Zheng D, Tan Y, Li R, et al. Astaxanthin ameliorates experimental diabetes-induced renal oxidative stress and fibronectin by upregulating connexin43 in glomerular mesangial cells and diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2018;840:33-43.

42. Luetic M, Vitlov Uljevic M, Masek T, Benzoni B, Vukojevic K, Filipovic N. PUFAs supplementation affects the renal expression of pannexin 1 and connexins in diabetic kidney of rats. *Histochem Cell Biol.* 2020;153(3):165-75.
43. Vitlov Uljevic M, Starcevic K, Masek T, Bocina I, Restovic I, Kevic N, et al. Dietary DHA/EPA supplementation ameliorates diabetic nephropathy by protecting from distal tubular cell damage. *Cell Tissue Res.* 2019;378(2):301-17.
44. Bermejo S, Pascual J, Soler MJ. The large spectrum of renal disease in diabetic patients. *Clin Kidney J.* 2017;10(2):255-6.
45. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(4):556-63.
46. Emdin CA, Rahimi K, Neal B, Callender T, Perkovic V, Patel A. Blood pressure lowering in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2015;313(6):603-15.
47. Bhat EA, Sajjad N. Human Pannexin 1 channel: Insight in structure-function mechanism and its potential physiological roles. *Mol Cell Biochem.* 2021;476(3):1529-40.
48. Navis KE, Fan CY, Trang T, Thompson RJ, Derksen DJ. Pannexin 1 Channels as a Therapeutic Target: Structure, Inhibition, and Outlook. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(15):2163-72.
49. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 2004;572(1-3):65-8.
50. Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:103-14.
51. Chiu YH, Schappe MS, Desai BN, Bayliss DA. Revisiting multimodal activation and channel properties of Pannexin 1. *J Gen Physiol.* 2018;150(1):19-39.
52. Crespo Yanguas S, Willebrords J, Johnstone SR, Maes M, Decrock E, De Bock M, et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(1):51-61.
53. Makarenkova HP, Shah SB, Shestopalov VI. The two faces of pannexins: new roles in inflammation and repair. *J Inflamm Res.* 2018;11:273-88.
54. Koval M, Cwiek A, Carr T, Good ME, Lohman AW, Isakson BE. Pannexin 1 as a driver of inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Purinergic Signal.* 2021;17(4):521-31.
55. Parzych K, Zetterqvist AV, Wright WR, Kirkby NS, Mitchell JA, Paul-Clark MJ. Differential role of pannexin-1/ATP/P2X(7) axis in IL-1beta release by human monocytes. *FASEB J.* 2017;31(6):2439-45.

56. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. 2016;535(7610):111-6.
57. Yang Y, Delalio LJ, Best AK, Macal E, Milstein J, Donnelly I, et al. Endothelial Pannexin 1 Channels Control Inflammation by Regulating Intracellular Calcium. *J Immunol*. 2020;204(11):2995-3007.
58. Prochnow N, Abdulazim A, Kurtenbach S, Wildforster V, Dvorientchikova G, Hanske J, et al. Pannexin1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning. *PLoS One*. 2012;7(12):e51767.
59. Yeung AK, Patil CS, Jackson MF. Pannexin-1 in the CNS: Emerging concepts in health and disease. *J Neurochem*. 2020;154(5):468-85.
60. Hernandez CA, Eliseo E. The Role of Pannexin-1 Channels in HIV and NeuroHIV Pathogenesis. *Cells*. 2022;11(14).
61. Huang G, Bao J, Shao X, Zhou W, Wu B, Ni Z, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. *Life Sci*. 2020;254:117791.
62. Lohman AW, Billaud M, Straub AC, Johnstone SR, Best AK, Lee M, et al. Expression of pannexin isoforms in the systemic murine arterial network. *J Vasc Res*. 2012;49(5):405-16.
63. Jankowski J, Perry HM, Medina CB, Huang L, Yao J, Bajwa A, et al. Epithelial and Endothelial Pannexin1 Channels Mediate AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):1887-99.
64. Li G, Zhang Q, Hong J, Ritter JK, Li PL. Inhibition of pannexin-1 channel activity by adiponectin in podocytes: Role of acid ceramidase activation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(10):1246-56.
65. DeLalio LJ, Masati E, Mendu S, Ruddiman CA, Yang Y, Johnstone SR, et al. Pannexin 1 channels in renin-expressing cells influence renin secretion and blood pressure homeostasis. *Kidney Int*. 2020;98(3):630-44.
66. Poudel N, Okusa MD. Pannexins in Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2019;143(3):158-61.
67. Yin F, Zheng PQ, Zhao LQ, Wang YZ, Miao NJ, Zhou ZL, et al. Caspase-11 promotes NLRP3 inflammasome activation via the cleavage of pannexin1 in acute kidney disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43(1):86-95.
68. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ*. 2008;86(8):650-2.

69. O'Rahilly R, Gardner E. The timing and sequence of events in the development of the human nervous system during the embryonic period proper. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1971;134(1):1-12.
70. Swayne LA, Bennett SA. Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC Cell Biol.* 2016;17 Suppl 1:10.
71. Worsdorfer P, Wagner N, Ergun S. The role of connexins during early embryonic development: pluripotent stem cells, gene editing, and artificial embryonic tissues as tools to close the knowledge gap. *Histochem Cell Biol.* 2018;150(4):327-39.
72. Levin M. Gap junctional communication in morphogenesis. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;94(1-2):186-206.
73. Carev D, Krnic D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babic M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(5):627-36.
74. Carev D, Saraga M, Saraga-Babic M. Involvement of FGF and BMP family proteins and VEGF in early human kidney development. *Histol Histopathol.* 2008;23(7):853-62.
75. Carev D, Saraga M, Saraga-Babic M. Expression of intermediate filaments, EGF and TGF-alpha in early human kidney development. *J Mol Histol.* 2008;39(2):227-35.
76. Filipovic N, Vukojevic K, Bocina I, Saraga M, Durdov MG, Kablar B, et al. Immunohistochemical and electronmicroscopic features of mesenchymal-to-epithelial transition in human developing, postnatal and nephrotic podocytes. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(4):481-95.
77. Hillman KA, Johnson TM, Winyard PJ, Burnstock G, Unwin RJ, Woolf AS. P2X(7) receptors are expressed during mouse nephrogenesis and in collecting duct cysts of the cpk/cpk mouse. *Exp Nephrol.* 2002;10(1):34-42.
78. Li H, Wang F. The role of connexin43 in diabetic microvascular complications. *Discov Med.* 2016;22(122):275-80.
79. Menzies RI, Tam FW, Unwin RJ, Bailey MA. Purinergic signaling in kidney disease. *Kidney Int.* 2017;91(2):315-23.
80. Ravindran S, Kuruvilla V, Wilbur K, Munusamy S. Nephroprotective Effects of Metformin in Diabetic Nephropathy. *J Cell Physiol.* 2017;232(4):731-42.
81. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(3):139-52.

## **9. SAŽETAK**



Paneksini su glikoproteini koji formiraju transmembranske kanale velikog promjera putem kojih se otpušta ATP u izvanstanični milje. Na taj način sudjeluju u purinergičkoj parakrinoj komunikaciji između stanica te imaju važnu ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima. Dijabetička nefropatija najčešći je uzročnik kroničnog bubrežnog zatajenja a njena patofiziologija i dalje nije potpuno jasna. Sve veći broj novijih studija ukazuje na ulogu izravne komunikacije između stanica i parakrinog ATP-a u patofiziologiji DN. U ovoj studiji istražena je glomerularna i tubularna ekspresija Panx1 u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 2 i kontrolne skupine te korelacija sa serumskim kreatininom kao pokazateljem bubrežne funkcije. Nađena je značajna pozitivna korelacija između ekspresije Panx1 u glomerulima i kreatinina u serumu, koja je bila izraženija u podskupini bolesnika s dijabetesom, a nije nađena izolirano u skupini bez dijabetesa. Naši podaci sugeriraju da je glomerularna ekspresija Panx1 potencijalni pokazatelj pogoršanja bubrežne funkcije u bolesnika s dijabetesom tipa 2.

S obzirom da do sada nema objavljenih podataka o ulozi Panx1 u razvoju bubrega, također je istražena ekspresija Panx1 u različitim fazama embrionalnog i ranog fetalnog razvoja. U 6. tjednu embrionalnog razvoja pronađena je ekspresija Panx1 u mezonefričkim glomerulima i mezonefričkim tubulima. Na prijelazu iz 6. u 7. tjedan embrionalnog razvoja, Panx1 imunoreaktivnost je nađena u mezonefričkim tubulima i mezonefričkom kanalu, kao i u metanefričkom pupoljku uretera i čašicama. U 7. tjednu embrionalnog razvoja, snažna Panx1 ekspresija primijećena je u mokraćovodnom pupoljku u metanefrosu, dok nije pronađena Panx1 imunoreaktivnost u metanefričkoj čašici. U 8. tjednu embrionalnog razvoja, ekspresija Panx1 također je pronađena u mokraćovodnom pupoljku u metanefrosu kao i u bubrežnom mjehuriću i nefronu u obliku zareza, te u epitelnim stanicama Bowmanove kapsule. Ekspresija Panx1 pronađena je u ranoj fazi u paramezonefričkom kanalu i u mezonefričkom kanalu, te se smanjivala prema 8. tjednu. Tijekom 6-10. tjedna kolokalizacija Panx1 s aSMA pronađena je u krvnim žilama u razvoju. U postnatalnom bubregu, jaka imunoreaktivnost Panx1 bila je prisutna u stanicama medularnog i kortikalnog sabirnog kanalića, stanicama koje proizvode renin i proksimalnim tubulima. Vrlo slaba Panx1 imunoreaktivnost pronađena je u određenim distalnim stanicama tubula i u silaznim tankim krakovima Henleove petlje. Imunoreaktivnost Panx1 također je pronađena u podocitima (obilježених nefrinom). Panx1 nije bio kolokaliziran s aSMA imunoreaktivnošću u žilama postnatalnog ljudskog bubrega, ali je bio prisutan u endotelu. Prostorno-vremenska ekspresija Panx1 tijekom ranih faza razvoja ljudskog bubrega podržava njegovu moguću ulogu u procesima stanične diferencijacije, migracije i pozicioniranja u razvoju ljudskog bubrega.

## **10. SUMMARY**

Pannexins are glycoproteins that form large diameter transmembrane channels through which ATP is released into the extracellular environment. In this way, they are involved in purinergic paracrine communication between cells and play an important role in various physiological and pathological processes. Diabetic nephropathy is the most common cause of chronic renal failure, and its pathophysiology is still not fully understood. A growing number of recent studies point to the role of direct communication between cell and paracrine ATP in the pathophysiology of DN. In this study, glomerular and tubular expression of Panx1 in patients with type 2 diabetes and control groups and its correlation with serum creatinine as an indicator of renal function were investigated. A significant positive correlation was found between glomerular Panx1 expression and serum creatinine, which was pronounced in the subgroup of patients with diabetes and was not found in isolation in the group without diabetes. Our data suggest that glomerular Panx1 expression is a potential indicator of worsening renal function in patients with type 2 diabetes.

In the absence of published data on the role of Panx1 in kidney development, the expression of Panx1 at different stages of embryonic and early fetal development was also investigated. At week 6 of embryonic development, Panx1 expression was found in mesonephric glomeruli and mesonephric tubules. At the transition from the 6th to the 7th week of embryonic development, Panx1 immunoreactivity was found in the mesonephric tubules and the mesonephric duct, as well as in the metanephric ureteric bud and ampullae. At week 7 of embryonic development, strong Panx1 expression was observed in the ureteric bud in the metanephros, whereas no Panx1 immunoreactivity was found in the metanephric cup. At week 8 of embryonic development, Panx1 expression was also detected in the ureteric bud in the metanephros as well as in the renal vesicle and comma-shaped nephron and in the epithelial cells of Bowman's capsule. Expression of Panx1 was found in the paramesonephric duct and mesonephric duct in the early phase and it diminished toward the 8th week. In the 6th to 10th week, colocalization of Panx1 with aSMA was detected in developing blood vessels. In the postnatal kidney, strong Panx1 immunoreactivity was present in medullary and cortical collecting duct cells, renin-producing cells, and proximal tubules. Very weak Panx1 immunoreactivity was found in certain distal tubule cells and in the descending thin limbs of the loop of Henle. Panx1 immunoreactivity was also found in podocytes (labelled with nephrin). Panx1 was not colocalized with aSMA immunoreactivity in postnatal human kidney vessels but was present in the endothelium. The spatiotemporal expression of Panx1 at early stages of human kidney development argues for its possible role in the processes of cell differentiation, migration, and positioning in human kidney development.

## **11. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

**Ime i prezime:** Ivo Jeličić  
**Datum i mjesto rođenja:** 5. svibnja 1980, Split  
**E-mail:** ivo.jelicic@gmail.com; ijelicic@kbsplit.hr

## **OBRAZOVANJE**

**1998 – 2004.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu  
**22. ožujka 2006.** Položen stručni ispit  
**2004 – 2006.** Poslijediplomski znanstveni studij Sveučilišta u Splitu  
smjer Klinička medicina  
**16. veljače 2015.** Položen specijalistički ispit iz interne medicine  
**15. prosinca 2017.** Položen ispit uže specijalizacije iz nefrologije

## **AKADEMSKI STUPNJEVI**

**10. veljače 2009.** Magistar znanosti – Magistarski rad na temu: „Utjecaj lokalne upale peritonejske membrane na ostatnu bubrežnu funkciju u bolesnika na peritonejskoj dijalizi“  
**16. veljače 2017 -** Asistent na Katedri Interna medicina

## **RADNO ISKUSTVO**

**prosinac 2004 – prosinac 2005.** Obvezan pripravnički staž u KB Split  
**prosinac 2006 – listopad 2010.** Znanstveni novak/asistent u KBC Split na projektu prof.dr.sc. Dragana Ljutića „Imunološke, hematološke, reološke i druge osobitosti uremijskog sindroma“  
**studeni 2010 – veljača 2015.** Specijalizacija iz Interne medicine, KBC Split  
**prosinac 2015 - prosinac 2017.** Uža specijalizacija iz nefrologije, KBC Split  
**veljača 2015 -** Specijalist na Zavodu za nefrologiju i dijalizu, KBC Split

ožujak 2019. –

Voditelj Dnevne bolnice – Hemodijalize na Zavodu za nefrologiju i dijalizu

## ČLANSTVA

2008 -

Hrvatski liječnički zbor

2008 -

Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju

2014 -

Europsko udruženje za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju

2019 -

Hrvatsko društvo za hipertenziju

2021 -

Hrvatsko društvo za bubreg

## PUBLIKACIJE

1. **Jelicic I**, Mladinov S. Rapidly progressive IgA nephritis and sarcoidosis. *IJKD* 2022;16:315-7
2. **Jeličić I**, Vukojević K, Racetin A, Čarić D, Glavina Durdov M, Saraga-Babić M, Filipović N. Expression of Pannexin 1 in the Human Kidney during Embryonal, Early Fetal and Postnatal Development and Its Prognostic Significance in Diabetic Nephropathy. *Biomedicines*, 2022;10(5):944.
3. Domjanović J, Matetic A, Baković Kramarić D, Domjanović Škopinić T, Borić Škaro D, Delić N, Runjić F, **Jeličić I**. Association of the novel CROW-65 risk score and mortality in hospitalized kidney transplant recipients with COVID-19: A retrospective observational study. *Wien Klin Wochenschr.* 2022;7:1–8.
4. **Jelicic I**. Relationship of food intake during hemodialysis and symptomatic intradialytic hypotension. *Hemodialysis International.* 2021;25:333– 337.
5. Basic-Jukic N, **Jelicic I**. SARS-CoV-2 infection after two doses of mRNA vaccine in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2021;23(4):e13628.
6. Ferara N, Lovrić Kojundžić S, Šain M, **Jeličić I**. Challenge of hemodialysis: A patient with glioblastoma cerebri, cerebral edema, and hemorrhagic stroke. *Ther Apher Dial.* 2021;25:124-125.
7. Laganovic M, Gellineo L, Bulimbasic S, ...**Jelicic I**, ..... Report of the Croatian registry of native kidney biopsies for year 2019. *Acta Clin Croatica* 2021;60:173-180.

8. Sain M, Burilovic V, Tomicic M, **Jelcic I**. High ANTI-PF4/Heparin Antibodies Titer and Thromboses Due to Infection 9 Months After Cessation of Heparin in Hemodialyzed Patient With Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Ther Apher Dial.* 2018;22:558-559.
9. Uglešić B, Ljutić D, Lasić D, **Jeličić I**, Višić V, Glavina T, Šundov Ž, Puljiz Ž, Cvitanović MŽ, Meter A. Depression and serum interleukin-6 levels in patients on dialysis. *Psychiatr Danub.* 2015;27:168-73.
10. Sain M, Kovacic V, Radic J, Ljutic D, **Jelcic I**. What are the lowest doses of low molecular weight heparin for effective and safe hemodialysis in different subgroups of patients? *Ther Apher Dial.* 2014;18:208-9.
11. Kovacic V, Ljutic D, **Jelcic I**, Sain M, Radic J, Radic M. Spleen Rupture Associated with Septic Emboli and Endocarditis in a Hemodialysis Patient. *Blood Purif.* 2013;35:177-80.
12. Kovačević LM, Puizina-Ivić N, Ljutić D, Brakus SM, Govorko DK, **Jeličić I**, Mirić D, Rešić J, Saraga-Babić M. Differences in epidermal thickness and expression of apoptosis regulatory proteins in the skin of patients with chronic renal failure and pruritus. *Acta Histochem.* 2013;115:144-50.
13. Bratanic A, Puljiz Z, Ljubicic N, Caric T, **Jelcic I**, Puljiz M, Perko Z. Predictive Factors of Rebleeding and Mortality Following Endoscopic Hemostasis in Bleeding Peptic Ulcers. *Hepatogastroenterology.* 2012;60:112-7.
14. Sain M, Ljutic D, Kovacic V, Radic J, **Jelcic I**. The influence of decreased low-molecular-weight heparin nadroparin dose on diastolic blood pressure in patients on hemodialysis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012;18:519-25.
15. Sain M, Kovacic V, Radic J, Ljutic D, **Jelcic I**. Potential beneficial effects of low molecular weight heparin on cognitive impairment in elderly patients on haemodialysis. *Drugs Aging.* 2012;29:1-7.
16. **Jelcic I**, Ljutic D, Sain M, Kovacic V, Radic J. Influence of local inflammation of the peritoneal membrane on diuresis and residual renal function in patients treated with peritoneal dialysis. *J Artif Organs.* 2012;15:65-70.
17. Sain M, Kovacic V, Radic J, Ljutic D, **Jelcic I**. Znamo li sve o učincima heparina u bolesnika liječenih hemodijalizom? *Acte Medica Croatica* 2012;66:215-20.
18. Sain M, Ljutic D, Kovacic V, Radic J, **Jelcic I**. The individually optimized bolus dose of nadroparin is safe and effective in diabetic and nondiabetic patients with bleeding risk on hemodialysis. *Hemodial Int.* 2011;15:52-62.

19. Skaro DB, **Jelicic I**, Ljutic D. Intraluminal stone in a PD catheter-a rare complication. *Perit Dial Int.* 2011;31:371-2.
20. Nowicki M, Rychlik I, Haller H, Warren ML, Suchower L, Gause-Nilsson I; D1680C00007 Investigators. Saxagliptin improves glycaemic control and is well tolerated in patients with type 2 diabetes mellitus and renal impairment. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13(6):523-32.
21. Puljiz Z, Puljiz M, **Jelicic I**, Hozo I. Accuracy of Ultrasound, Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in Diagnose of Steatosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Acta Inform Med.* 2010;18:136-9.

### **Članci publicirani u drugim međunarodno indeksiranim časopisima:**

1. Ljutić D, **Jeličić I**. Drugs Targeting the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Medicus* 2010;19:39-46.
2. Ljutić D, **Jeličić I**. Resistant arterial hypertension. *Medicus* 2008;16:195-199.

### **Poglavlja u knjizi:**

1. **Jeličić I**. Tuberkuloza urogenitalnog sustava. U: Tuberkuloza: stara dama u novom ruhu. Anamarija Jurčev Savičević, Miše Kornelija i sur. Medicinska naklada, Zagreb 2021.
2. Ljutić D, **Jeličić I**. Nefrološka propedeutika U: Internistička propedeutika. Izet Hozo i sur. Split: Hrvatsko gastroenterološko društvo, 2013. 246-260.
3. Ljutić D, **Jeličić I**. Rezistentna arterijska hipertenzija U: Koronarna bolest, 2. izdanje. Dinko Mirić, i sur. Split: Hrvatsko kardiološko društvo, 2009. 254-262

### **Priznanja:**

1. Zahvalnica Hrvatskog liječničkog zbora za unaprijeđenje medicinske struke te zdravstvenu i humanitarnu djelatnost 2020. g.