

Imunohistokemijski izražaj gena za popravak pogrešno sparene DNA i čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije u bubrezima štakora sa šećernom bolesti tipa 1

Dragun Jurić, Matea

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:261213>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

MATEA DRAGUN JURIĆ, dr. med.

**IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ GENA ZA POPRAVAK POGREŠNO SPARENE
DNA I ČIMBENIKA EPITELNO-MEZENHIMALNE TRANZICIJE U BUBREZIMA
ŠTAKORA SA ŠEĆERNOM BOLESTI TIP 1**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2023.

Ova doktorska disertacija izrađena je pri Katedri za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te u Laboratoriju za rani razvoj čovjeka Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

ZAHVALA

Najiskrenije zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Katarini Vukojević, što je na svakom koraku izrade ove doktorske disertacije bila prvenstveno prijatelj, a onda i motivator i učitelj. Hvala na usmjeravanjima, savjetima, prenesenom znanju i podršci. Hvala na svemu!

Zahvaljujem izv.prof. dr. sc. Nataliji Filipović i prof. dr. sc. Sandri Kostić na stručnoj i nesebičnoj pomoći od mog prvog susreta sa znanosti.

Također zahvaljujem svim kolegama Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na nesebičnoj pomoći i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije, posebice dr. sc. Aniti Racetin koja je čitavo ovo vrijeme bila na „brzom biranju“ i bez koje ništa od ovoga ne bi bilo realizirano, kao i Neli Kelam na pomoći pri izvođenju eksperimenta i sakupljanju uzoraka.

Posebna zahvala mojoj obitelji kojoj posvećujem ovu doktorsku disertaciju, a ponajviše trima najvažnijim osobama u mom životu – suprugu Josipu, našem malom Stipi i mami Ljerki koji su uvijek bili moj vjetar u leđa i bezuvjetna podrška na svim mojim životnim putevima.

Hvala vam na svojoj ljubavi i strpljenju!

SADRŽAJ

1. UVOD	4
1.1. Anatomija i struktura bubrega	5
1.2. Fiziologija i funkcija bubrega.....	5
1.3. Poremećaj bubrežne funkcije – akutno i kronično bubrežno zatajenje	6
1.4. Građa i funkcija štakorskog bubrega	7
1.5. Šećerna bolest – prevalencija, etiologija, dijagnostika.....	7
1.6. Tipovi šećerne bolesti.....	9
1.6.1. Gestacijski dijabetes	9
1.6.2. MODY	10
1.6.3. LADA	10
1.6.4. Šećerna bolest uzrokovana bolestima gušterače i lijekovima	10
1.6.5. Šećerna bolest tipa 2 (DM2).....	11
1.6.6. Šećerna bolest tipa 1 (DM1).....	12
1.7. Komplikacije hiperglikemije i šećerne bolesti	12
1.7.1. Akutne komplikacije šećerne bolesti	13
1.7.2. Kronične komplikacije šećerne bolesti.....	14
1.8. Dijabetička bolest bubrega	15
1.8.1. Klinička slika, diferencijalna dijagnoza i dijagnostički postupci dijabetičke bolesti bubrega	15
1.8.2. Liječenje dijabetičke bolesti bubrega	16
1.8.3. Patofiziološki mehanizmi i morfološke karakteristike dijabetičke bolesti bubrega.....	17
1.9. Geni za popravak pogrešno sparene DNA	19
1.9.1. MutL protein homolog 1 – MLH1.....	21
1.9.2. MutS protein homolog 2 – MSH2	22
1.9.3. Post-mejotički segregacijski protein 2 - PMS2	23

1.9.4. Membranski protein H2A histon X - γ H2AFX.....	24
1.10. Epitelno-mezenhimalna tranzicija.....	25
1.10.1. Epitelno-mezenhimalna tranzicija u tkivu bubrega.....	26
1.10.2. Snail.....	27
1.10.3. Wnt4.....	28
1.10.4. Notch2.....	28
2. CILJEVI I HIPOTEZE.....	30
2.1. Ciljevi.....	31
2.2. Hipoteza.....	32
3. MATERIJALI I METODE.....	33
3.1. Etičko odobrenje.....	34
3.2. Pokusne životinje.....	34
3.3. Indukcija i utvrđivanje šećerne bolesti.....	34
3.4. Prikupljanje i priprema tkiva.....	35
3.5. Imunohistokemijsko bojenje i mikroskopska obrada.....	35
3.6. Analiza slika i kvantifikacija.....	37
3.7. Statistička analiza.....	37
3.7.1 Izračun veličine uzorka.....	37
3.7.2 Statistički postupci.....	37
4. REZULTATI.....	39
4.1. Prikaz hematoksilin-eozin bojenja preparata bubrežnog tkiva kontrolnih i dijabetičkih štakora.....	40
4.2. Ukupan broj MLH1, γ H2AFX, PMS2 i MSH2 pozitivnih stanica u bubrezima dijabetičke i kontrolne skupine štakora.....	40
4.3. MLH1, γ H2AFX, PMS2 i MSH2 pozitivne stanice u različitim strukturama bubrežne kore dijabetičkih i kontrolnih bubrega.....	42
4.4. Ukupan broj Snail, Wnt4 i Notch2 pozitivnih stanica u bubrezima dijabetičke i kontrolne skupine štakora.....	46

4.5. Snail, Wnt4 i Notch2 pozitivne stanice u različitim strukturama bubrežne kore dijabetičkih i kontrolnih bubrega	47
5. RASPRAVA.....	52
6. ZAKLJUČCI.....	63
7. SAŽETAK.....	65
8. SUMMARY	67
9. LITERATURA.....	69
10. ŽIVOTOPIS	87

POPIS OZNAKA I KRATICA

DM	šećerna bolest (engl. diabetes mellitus)
DM1	šećerna bolest tipa 1 (engl. diabetes mellitus type I)
DM2	šećerna bolest tipa 2 (engl. diabetes mellitus type II)
STZ	streptozotocin (engl. streptozotocine)
DN	dijabetička nefropatija (engl. diabetic nephropathy)
DKD	dijabetička bolest bubrega (engl. diabetic kidney disease)
MMR	geni za popravak pogrešno sparene DNA (engl. mismatch repair genes)
MLH1	MutL protein homolog 1 (engl. MutL protein homolog 1)
MSH2	MutS protein homolog 2 (engl. MutS protein homolog 2)
PMS2	Post-mejotički segregacijski protein 2 (engl. Post-meiotic segregation protein 2)
H2AFX	Membranski protein H2A histon X (engl. H2A histone family member X)
γH2AFX	Fosforilirani oblik membranskog proteina H2A histona X (engl. phosphorylated form of H2A histone family member X)
AGE	konačni produkti glikacije (engl. advanced glycation end products)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)
WHO/SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)
ADP	adenozin difosfat (engl. adenosine diphosphate)
ATP	adenozin trifosfat (engl. adenosine triphosphate)
PCNA	proliferirajući stanični jezgreni antigen (engl. proliferating cell nuclear antigen)
EXO1	egzonukleaza 1 (engl. exonuclease 1)
MSI	mikrosatelitna nestabilnost (engl. microsatellite instability)
HNPCC	nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. hereditary non-polyposis colorectal carcinoma)
ATM	ataksija-teleangiektazija mutirajući protein (engl. ataxia teleangiectasia mutated protein)
ATR	ataksija-teleangiektazija RAD 3 povezani protein (eng. ataxia-teleangiectasia RAD 3 related protein)

DNA-PK	protein kinaza ovisna o DNA (engl. DNA-dependent protein kinase)
DSB DNA	dvolančani prekidi DNA (engl. double strand breaks DNA)
MDC1	protein 1 kontrolne točke oštećenja DNA (engl. mediator of DNA damage checkpoint protein 1)
BRCA 1	protein osjetljivosti na rak dojke tip 1 (engl. breast cancer type 1 susceptibility protein)
53BP1	tumor supresorski p53-vezujući protein tip 1 (engl. tumor suppressor p53-binding protein 1)
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. epithelial to mesenchymal transition)
α-SMA	antigen glatkih mišića α (engl. α -smooth muscle antigen)
HIF 1α	hipoksija inducibilni čimbenik 1 α (engl. hipoxia-inducibile factor 1 α)
TGFβ	transformirajući čimbenik rasta β (engl. transforming growth factor β)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor)
SGLT	natrij/glukoza ko-transporter (engl. sodium/glucose co-transporter)
ROS	reaktivni metaboliti kisika (engl. reactive oxygen species)
AKI	akutna ozljeda bubrega (engl. acute kidney injury)
PARP	poli ADP-ribozna polimeraza-1 (engl. poly(ADP-ribose) polymerase-1)
eGFR	procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. estimated glomerular filtration rate)
IGF	inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. insulin like growth factor)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor)
G	glomerul (engl. glomerulus)
PCT	proksimalni zavijeni kanalić (eng. proximal convoluted tubule)
DCT	distalni zavijeni kanalić (engl. distal convoluted tubule)
ACR	albumin/kreatinin omjer (engl. albumin creatinin ratio)
OGTT	oralni test podnošljivosti glukoze (engl. oral glucose tolerance test)
GLP-1	glukagonu sličan peptid 1 (engl. glucagone-like peptide 1)
DPP4	dipeptidil peptidaza 4 (engl. dipeptidyl peptidase-4)
HLA	ljudski leukocitni antigeni (engl. human leucocyte antigens)
GAD	dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. glutamic acid decarboxylase)

ICA	protutijela na Langerhansove otočiće (engl. islet cell autoantibodies)
IAA	protutijela na endogeni inzulin (engl. insulin autoantibodies)
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (engl. renin-angiotensin-aldosterone system)
RAGE	receptor završnih produkata glikacije (engl. receptor of advanced glycation endproducts)
MSH 3	MutS protein homolog 3 (engl. MutS protein homolog 3)
MSH 5	MutS protein homolog 5 (engl. MutS protein homolog 5)
MSH 6	MutS protein homolog 6 (engl. MutS protein homolog 6)
MLH 3	MuL protein homolog 3 (engl. MutL protein homolog 3)
PMS 1	Post-mejotički segregacijski protein 1 (engl. post-meiotic segregation protein 1)
Snai/SNAIL	transkripcijski represor obitelji proteina cinkovog-prstena Snail 1 (engl. Zinc-finger 1 protein family member Snail)
SLUG	transkripcijski represor obitelji proteina cinkovog-prstena Snail 2 (engl. Zinc-finger 2 protein family member Snail)

1. UVOD

1.1. Anatomija i struktura bubrega

U ljudskom organizmu, bubrezi su parni organi prosječne duljine 12 cm smješteni u retroperitonealnom prostoru s obje strane kralježnice, ispod ošita te posteriorno od jetre i slezene (1). Desni bubreg je prosječno nešto manji i položen niže u odnosu na lijevi bubreg zbog fiziološke asimetrije uzrokovane položajem jetre u desnom dijelu trbušne šupljine. Iznad svakog bubrega nalazi se odgovarajuća nadbubrežna žlijezda uz prilježne perirenalno i pararenalno masno tkivo (2). Svaki bubreg ima konveksni i konkavni dio na kojem je smješten bubrežni hilus. U bubrežni hilus ulazi bubrežna arterija kao ogranak abdominalne aorte i kao glavna krvna žila koja opskrbljuje bubreg krvlju kao i periferni živci zaslužni za inervaciju bubrega. S druge strane, iz bubrežnog hilusa izlaze bubrežna vena i mokraćovod koji omogućuje otjecanje urina stvorenog u mokraćni mjehur. Bubrežni parenhim se sastoji od bubrežne kore i bubrežne srži organizirane u bubrežne piramide (1, 2). Svaki bubreg ima prosječno 750 000 – 1,5 milijuna nefrona koji predstavljaju osnovnu strukturnu i funkcionalnu jedinicu bubrega. Nefroni se sastoje od glomerula, klupka kapilara okruženih tzv. glomerularnom ili Bowmanovom čahuricom. Glomeruli predstavljaju početno mjesto filtracije i ultrafiltracije krvi, a potom slijede bubrežni kanalići, i to proksimalni zavijeni kanalići, sužena Henleova petlja, distalni zavijeni kanalići i sabirni kanalići koji se protežu kroz bubrežne piramide (3) u kojima se konačno formira urin.

1.2. Fiziologija i funkcija bubrega

U procesu filtracije i ultrafiltracije krvi krvne stanice i velike molekule se zadržavaju u kapilarama, dok se molekule male molekularne mase filtriraju i formiraju ultrafiltrat (4). U tubularnom sustavu bubrega događa se proces reapsorpcije kojim se određene molekule ponovno transportiraju iz lumena kanalića u peritubularne kapilare i krvotok. U bubrežnim se kanalićima odvija i obrnuti proces ekskrecije kojim se tvari prenose iz peritubularnih kapilara u lumen kanalića (5). Tako se u proksimalnim zavijenim kanalićima reapsorbiraju određene aminokiseline, bikarbonati, fosfati, gotovo 55 % filtrirane vode i u uvjetima normoglikemije gotovo sva filtrirana glukoza putem natrij/glukoza ko-transportera (*engl. sodium glucose co-transporter, SGLT*) (6). Voda se nastavlja reapsorbirati i u suženom dijelu Henleove petlje te u sabirnim kanalićima što je regulirano antidiuretskim hormonom što čini urin hipertoničnim, dok se u distalnim zavijenim kanalićima reapsorbiraju natrij, kloridi i kalcij pod utjecajem paratiroidnog hormona (5). Bubrezi imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze ekstracelularnog volumena tekućine i posljedično u kontroli arterijskog krvnog tlaka, ali i

održavanju osmolalnosti krvi, acidobaznog statusa, koncentraciji elektrolita i eliminaciji različitih toksina. Štoviše, bubrezi djeluju i kao aktivan endokrinološki organ sa sekrecijom niza hormonski aktivnih tvari poput eritropoetina, kalcitriola i renina (7-9). Bubrezi sudjeluju i u poticanju eritropoeze kao odgovor na hipoksiju, omogućuju crijevnu apsorpciju kalcija i tubularnu reapsorpciju fosfata djelovanjem kalcitriola kao aktivnog oblika vitamina D te utječu na homeostazu volumena tekućine i vrijednosti arterijskog krvnog tlaka putem renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (*engl. renin-angiotensin-aldosteron system, RAAS*) (10-12).

1.3. Poremećaj bubrežne funkcije – akutno i kronično bubrežno zatajenje

Mnogo je potencijalnih uzroka poremećaja bubrežne funkcije, a isti se mogu podijeliti na nasljedne uzroke i uzroke stečene tijekom života. U nasljedne uzroke poremećaja bubrežne funkcije spadaju autosomno dominantna policistična bubrežna bolest, cistinoza, Alportov i Gitelmanov sindrom, Fabryjeva bolest, tuberozna skleroza i druge. Najčešći stečeni uzroci poremećaja bubrežne funkcije su dijabetička nefropatija tj. dijabetička bolest bubrega, nefrolitijaza s opstruktivnom uropatijom i hidronefrozom, različiti glomerulonefritisi, tumori bubrega, bubrežne infekcije te ishemijske ozljede bubrega (13-17). U najtežem slučaju, poremećaj bubrežne funkcije se može manifestirati kao akutno ili kronično bubrežno zatajenje (18). Akutno bubrežno zatajenje ili akutna ozljeda bubrega (*engl. acute kidney injury, AKI*) predstavlja nagli pad bubrežne funkcije koji se događa unutar 7 dana, a koji je karakteriziran smanjenjem izlučivanja urina tj. diureze, značajnim porastom serumskog kreatinina ili oboje (19). Akutno bubrežno zatajenje se, ovisno o etiološkom čimbeniku koje je do njega dovelo, dijeli na prerenalno, renalno i postrenalno bubrežno zatajenje (20). Prerenalno bubrežno zatajenje nastaje kao posljedica nedostatne opskrbe bubrega krvlju što se događa u slučaju izražene dehidracije, hipotenzije, sepse, različitih vrsta urušaja, srčanog popuštanja i jetrene ciroze. Postrenalno bubrežno zatajenje nastaje opstrukcijom kanalnog sustava bubrega uz nemogućnost otjecanja urina posljedično zbog prisutnosti bubrežnih ili ureteralnih kamenaca, tumora ili anatomskih anomalija (21, 22). Renalno ili intrinzično bubrežno zatajenje nastaje zbog izravnog oštećenja bubrežnog tkiva djelovanjem kemoterapeutika i određenih antibiotika, razvoja glomerulonefritisa, lupusnog nefritisa, akutne tubularne nekroze i drugih (23, 24). S druge strane, kronično bubrežno zatajenje karakterizira postupni gubitak bubrežne funkcije koji se događa tijekom nekoliko mjeseci ili godina zbog šećerne bolesti, arterijske hipertenzije, glomerulonefritisa i policistične bubrežne bolesti koji čine najčešće uzroke istoga (25). Kronično bubrežno popuštanje se u samom početku ne očituje izraženim simptomima, dok se s vremenom javljaju različiti klinički

znakovi i simptomi poput slabosti i malaksalosti, gubitka apetita, mučnine, povraćanja, konfuzije i oticanja udova. Također se mogu zamijetiti znakovi azotemije i hipervolemije kao arterijska hipertenzija, metabolička acidoza, hiperkalijemija i hiperfosfatemija te anemija koje uobičajeno prate kronični poremećaj bubrežne funkcije (26). Ovisno o procijenjenoj brzini glomerularne filtracije (*engl. estimated glomerular filtration rate, eGFR*) kronično bubrežno zatajenje može se podijeliti u pet stadija, i to: 1. stadij kada je $eGFR > 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, 2. stadij kada je $eGFR 60 - 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, 3. stadij kada je $eGFR$ između $30 - 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, 4. stadij kada je $eGFR 15 - 30 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ te posljednji 5. ili završni stadij kroničnog bubrežnog zatajenja koji nastaje u slučaju izraženog pada $eGFR$ ispod $15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ (27). Također, kronična bubrežna bolest se prema razini albumin/kreatinin omjera (*engl. albumin creatinin ratio, ACR*) može podijeliti na dodatna tri stadija: A1 – kada je $ACR < 30$, A2 – kada je ACR između $30 - 300$ i A3 – kada je ACR veći od 300 (28). Bolesnici u završnom stadiju kroničnog bubrežnog zatajenja zahtijevaju različite postupke nadomjesnog bubrežnog liječenja poput hemodijalize ili peritonealne dijalize, a u konačnici nerijetko i transplantaciju bubrega (29-31).

1.4. Građa i funkcija štakorskog bubrega

Bubreg štakora je općeprihvaćen model za istraživanje strukture i fiziologije bubrega sisavaca. Za razliku od ljudskog bubrega, bubreg štakora je unipapilarni bubreg. U histološkim presjecima bubrežna kora ima oblik čaše, s obrnutim rubovima čime okružuje srž bubrega (32). Bubreg štakora ima četiri različita sloja koji sadrže određene dijelove nefrona. Bubrežna kora bubrega štakora analogna je ljudskoj kori, a prevladavajuća struktura u korteksu bubrega je glomerul, kao i proksimalni i distalni zavijeni kanalići koji su odgovorni za reapsorpciju 70 - 80 % glomerularnog filtrata. Unutarnja medula štakorskog bubrega analogna je srži bubrega čovjeka, gdje obje sadrže suženi dio Henleove petlje i sabirne kanaliće. Bubreg štakora ima dva dodatna sloja smještena između kore i unutarnje medule, a to su vanjski i unutarnji omotač vanjske medule (33).

1.5. Šećerna bolest – prevalencija, etiologija, dijagnostika

Šećerna bolest (*engl. diabetes mellitus, DM*) je skup metaboličkih poremećaja čija incidencija i prevalencija bilježe porast u cijelom svijetu, najizraženije u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Prema posljednjim statističkim analizama, globalna prevalencija šećerne bolesti u odrasloj populaciji u dobi od 20 do 79 godina iznosila je u 2021. godini 10,5 %, s

pretpostavkom daljnjeg rasta do čak 12,5 % u 2045. godini. Navedeno upućuje da će do 2045. godine gotovo 650 milijuna ljudi bolovati od šećerne bolesti kao jedne od najčešćih kroničnih metaboličkih bolesti današnjice (34). Osim visoke incidencije i prevalencije koja je gotovo jednaka kod muškaraca i žena, šećernu bolest prate i visoka stopa morbiditeta i mortaliteta zbog čega je šećerna bolest 7. po učestalosti uzrok smrtnosti u svijetu. Štoviše, gotovo 1,5 milijuna smrtnih slučajeva u svijetu godišnje nastaje kao posljedica neliječene ili slabo liječene šećerne bolesti (35). Šećerna bolest je kao endokrini poremećaj primarno karakterizirana povećanom koncentracijom glukoze u krvi koja nastaje kao posljedica smanjenja to jest nedostatne proizvodnje inzulina u β -stanicama Langerhansovih otočića gušterače ili kao posljedica rezistencije, tj. neosjetljivosti perifernih tkiva na djelovanje inzulina (36). Naime, inzulin kao anabolički hormon koji se oslobađa iz β -stanica Langerhansovih otočića gušterače kao odgovor na hiperglikemiju neposredno nakon jela djeluje na način da potiče prijenos glukoze u mišićne i masne stanice uz pohranu glukoze u obliku glikogena. S druge strane inzulin sprječava razgradnju glikogena i glukoneogenezu – biosintezu glukoze iz neugljikohidratnih supstanci poput laktoze i drugih (37). U slučaju snižene koncentracije glukoze u krvi – hipoglikemije, smanjuje se otpuštanje inzulina, a dolazi do pojačanog otpuštanja njegovog kontraregulatornog hormona glukagona koji smanjuje prijenos glukoze u periferna tkiva te potiče glikogenolizu i glukoneogenezu (38). Osim poremećaja metabolizma ugljikohidrata, šećernu bolest karakterizira i poremećaj metabolizma lipida, proteina i ostalih sastavnica organizma. Naime, u slučaju nedostatne aktivnosti inzulina ne dolazi do apsorpcije glukoze u ciljne stanice kao ni do njene pohrane u jetrenom i mišićnom tkivu (39). Posljedično tome dolazi do razvoja povećane razine glukoze u krvi, smanjene sinteze bjelančevina, lipolize ili razgradnje masti uz povećanu razinu slobodnih masnih kiselina u perifernoj krvi i posljedičnu metaboličku acidozu (40). Kada je razina glukoze u krvi dulje vrijeme veća od 10,5 mmol/L, dolazi do prelaska bubrežnog praga reapsorpcije glukoze te se ista pojačano izlučuje urinom u obliku glukozurije i prateće osmotske diureze koja nastaje zbog povećanja osmotskog tlaka mokraće i smanjene reapsorpcije vode u bubrezima (41). Posljedično tome razvijaju se glavni simptomi šećerne bolesti: poliurija – prekomjerno mokrenje, polidipsija – prekomjerno žedanje i polifagija – prekomjerna glad. Ostali simptomi šećerne bolesti mogu uključivati gubitak tjelesne težine, zamućen vid, glavobolju, malaksalost, svrbež kože, otežano cijeljenje rana i druge (42). Klinički znakovi i simptomi šećerne bolesti mogu se pojaviti naglo kao u tipu 1 šećerne bolesti, ili pak znatno sporije kao u tipu 2 šećerne bolesti koju nerijetko u trenutku postavljanja dijagnoze prate već razvijene kronične komplikacije šećerne bolesti poput dijabetičke retinopatije, nefropatije i neuropatije (43). Dijagnoza šećerne bolesti postavlja se na temelju nekoliko parametara: izmjerena razina

glukoze u krvi natašte ≥ 7 mmol/L u dva neovisna mjerenja (nakon 8 sati vremena bez unosa kalorija), slučajan nalaz glukoze u krvi $\geq 11,1$ mmol/L, nalaz glukoze u krvi 2 sata poslije opterećenja glukozom (*engl. oral glucose tolerance test, OGTT*) $\geq 11,1$ mmol/L u dva neovisna mjerenja ili glikirani hemoglobin - HbA1c kao odraz prosječne tromjesečne razine šećera u krvi $\geq 6,5$ % (44). Upravo je glikirani hemoglobin glavna mjera ishoda i razvoja kroničnih komplikacija šećerne bolesti (45). Točna etiologija šećerne bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Osim genetske predispozicije, važni etiološki čimbenici razvoja šećerne bolesti su nepovoljne životne navike poput pušenja, prekomjerne tjelesne težine, neadekvatne prehrane bogate zasićenim masnim kiselinama i ugljikohidratima, nedostatna tjelesna aktivnost i drugi (46). Ne postoji poznata mjera prevencije šećerne bolesti tipa 1, no na pojavu šećerne bolesti tipa 2 možemo utjecati redukcijom tjelesne težine, uravnoteženom prehranom, adekvatnom fizičkom aktivnošću, izbjegavanjem pušenja i drugim povoljnim životnim navikama kao i kontrolom drugih čimbenika rizika poput hiperkolesterolemije i arterijske hipertenzije (47). Adekvatna kontrola glikemije se smatra ključnim korakom u sprječavanju ili odgađanju razvoja kroničnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti (48).

1.6. Tipovi šećerne bolesti

S obzirom na uzrok, ovaj metabolički poremećaj se može podijeliti na dva osnovna tipa: šećerna bolest tip 1 (*engl. diabetes mellitus type 1, DM1*) ili o inzulinu ovisan tj. juvenilni oblik šećerne bolesti, i šećerna bolest tip 2 (*engl. diabetes mellitus type 2, DM2*) ili o inzulinu neovisan tj. adultni oblik šećerne bolesti. Šećerna bolest tipa 2 najčešći je oblik šećerne bolesti koji čini otprilike 85 - 90 % svih slučajeva te se javlja uglavnom u srednjoj i starijoj životnoj dobi, a karakterizirana je neosjetljivošću perifernih tkiva na inzulin. Svega 5 - 10 % svih slučajeva šećerne bolesti čini šećerna bolest tipa 1 koja se najčešće javlja u mlađoj životnoj dobi kao posljedica nedostatnog lučenja inzulina (49). Osim navedenih, poznati su još neki manje česti tipovi šećerne bolesti poput gestacijskog dijabetesa, šećerne bolesti povezane s bolestima gušterače, šećerne bolesti uzrokovane lijekovima te MODY (*engl. maturity onset diabetes of the young*) i LADA (*engl. latent autoimmune diabetes in adults*) kao posebni oblici šećerne bolesti (43).

1.6.1. Gestacijski dijabetes

Gestacijski dijabetes je oblik šećerne bolesti tipa 2 koji se javlja za vrijeme trudnoće u žena koje do tada nisu imale šećernu bolest. Nastaje kao posljedica kombinacije neadekvatnog

lučenja inzulina i neosjetljivosti perifernih tkiva na inzulin (50). Gestacijski dijabetes se može pronaći u 2 - 10 % svih trudnoća i u većini slučajeva nestaje nakon poroda. Ipak, čak 5 - 10 % žena koje su imale gestacijski dijabetes kasnije tijekom života razvijaju neki od oblika šećerne bolesti, najčešće šećernu bolest tipa 2 (51). U liječenju gestacijskog dijabetesa koriste se primarno dijetetske mjere, a u manjem broju slučajeva potrebno je farmakološko liječenje, i to inzulinska terapija (52, 53). Osim navedenog, potrebno je učestalije praćenje trudnica s gestacijskim dijabetesom radi veće učestalosti makrosomije i različitih malformacija ploda, uključujući skeletne, neurološke i srčane malformacije (54).

1.6.2. MODY

MODY je autosomno dominantni nasljedni oblik šećerne bolesti koji nastaje zbog mutacije gena koji uzrokuju poremećaje u produkciji inzulina. MODY čini svega 1 – 2 % svih slučajeva šećerne bolesti (55). Ovisno o mutaciji gena koja je prisutna, može se podijeliti na najmanje 13 tipova od kojih je MODY 2 najčešći, a isti nastaje zbog mutacije gena glukokinaze koja pomaže metabolizam glukoze u jetri (56). O specifičnoj mutaciji gena ovisi i klinička prezentacija i dob javljanja bolesti, no najčešće se MODY prvi put prezentira u mlađoj životnoj dobi, 15. - 25. godine života. Bolesnici oblikom šećerne bolesti MODY u najvećem broju slučajeva euglikemiju mogu duže vrijeme održavati bez primjene inzulina (57).

1.6.3. LADA

LADA je sporo progresivan oblik autoimune šećerne bolesti koji je sličan šećernoj bolesti tipa 1, ali se za razliku od nje javlja nešto kasnije, prosječno iza 30. godine života. Zbog navedenog se LADA ponekad pogrešno dijagnosticira kao šećerna bolest tipa 2 (58). Nastaje kao posljedica prisutnosti antitijela na β -stanice gušterače s posljedično smanjenom proizvodnjom inzulina. Ipak, bolesnici s ovim oblikom bolesti rjeđe i kasnije zahtijevaju primjenu inzulina od bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 (59).

1.6.4. Šećerna bolest uzrokovana bolestima gušterače i lijekovima

Različite akutne i kronične bolesti gušterače kao što su recidivi akutnog pankreatitisa, kronični pankreatitis, fibrokalkulozna pankreatopatija, cistična fibroza, hereditarna hemokromatoza i druge mogu u konačnici destrukcijom tkiva gušterače dovesti do

smanjene produkcije inzulina i razvoja šećerne bolesti (60, 61). Također, destrukcija tkiva gušterače se može dogoditi i u nizu virusnih infekcija koje zahvaćaju gušteraču, poput citomegalovirusne infekcije i infekcije virusom *Coxsackie B*. Poznat je razvoj šećerne bolesti u nizu endokrinopatija, kao što su Cushingov sindrom, hipertireoidizam, hipotireoidizam te feokromocitomom i glukagonomom inducirana endokrinopatija (62). Štoviše, i različiti lijekovi poput kortikosteroida, levotiroksina, statina i β -adrenergičkih agonista mogu dovesti do hiperglikemije i razvoja šećerne bolesti (63).

1.6.5. Šećerna bolest tipa 2 (DM2)

Šećerna bolest tipa 2 ili oblik šećerne bolesti neovisan o inzulinu javlja se pretežno u odrasloj životnoj dobi, najčešće iza 50. godine života. Ipak, sve češće se šećerna bolest tipa 2 pojavljuje i u mlađoj životnoj dobi, čak i kod adolescenata, i to zbog porasta učestalosti pretilosti, neadekvatne prehrane i sjedilačkog načina života. Navedeni čimbenici se, uz genetsku predispoziciju, smatraju glavnim etiološkim čimbenicima šećerne bolesti tipa 2 (46, 47). Kao što je ranije spomenuto, DM2 nastaje kao posljedica neosjetljivosti perifernih tkiva na inzulin (64). U početnoj fazi bolesti javlja se kompenzatorni odgovor u smislu hipersekrecije inzulina, no s vremenom dolazi do iscrpljivanja β -stanica Langerhansovih otočića gušterače s posljedičnim smanjenjem izlučivanja inzulina (65). Većina bolesnika prije razvoja šećerne bolesti tipa 2 pokazuje znakove predijabetesa. Predijabetes je stanje kojeg karakteriziraju granične vrijednosti glukoze u krvi od 5,6 do 6,9 mmol/L natašte te vrijednosti OGTT-a od 7,8 do 11 mmol/L dva sata nakon obroka. Progresija predijabetesa u šećernu bolest može biti spriječena ili odgođena dijetetskim mjerama i lijekovima koji povećavaju osjetljivost perifernih tkiva na inzulin ili smanjuju jetrenu produkciju glukoze (66). Osim higijensko-dijetetskih mjera, u liječenju šećerne bolesti tipa 2 koriste se različiti lijekovi koji povećavaju izlučivanje inzulina poput derivata sulfonilureje, povećavaju osjetljivost perifernih tkiva na inzulin poput bigvanida metformina, smanjuju reapsorpciju glukoze u proksimalnim zavijenim kanalčićima bubrega poput SGLT-inhibitora ili pak djeluju kao glukagonu sličan peptid 1 (*engl. glucagon-like peptide 1, GLP-1*) agonisti ili dipeptidil peptidaza 4 (*engl. dipeptidyl peptidase-4, DPP4*) inhibitori (67). S obzirom na spomenuti relativni nedostatak inzulina koji se u konačnici događa i u šećernoj bolesti tipa 2, bolesnici koji boluju od navedene bolesti nerijetko zahtijevaju i inzulinsku terapiju (68).

1.6.6. Šećerna bolest tipa 1 (DM1)

Šećerna bolest tipa 1 je idiopatski, tj. imunološki posredovan oblik šećerne bolesti u kojem dolazi do stvaranja različitih protutijela koja u konačnici dovode do destrukcije β -stanica Langerhansovih otočića gušterače koje u normalnim uvjetima proizvode inzulin (69). Zbog navedenog je u liječenju DM1 nužna primjena inzulina te se stoga ovaj tip naziva i inzulin ovisna šećerna bolest (70). Pojavljuje se češće u mlađoj životnoj dobi, kod djece i adolescenata (36). Osim okolišnih čimbenika u koje se primarno ubrajaju virusne infekcije, ključnu ulogu u nastanku šećerne bolesti tipa 1 imaju i nasljedni čimbenici, i to najizraženije tzv. HLA – ljudski leukocitni antigeni (*engl. human leukocyte antigens*) DR3/DR4 (71). Kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 mogu se naći različita protutijela, uključujući protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (*engl. glutamic acid decarboxylase, GAD*), protutijela na Langerhansove otočiće (*engl. islet cell autoantibodies, ICA*) te protutijela na endogeni inzulin (*engl. insulin autoantibody, IAA*) (72). Ova autoantitijela dovode do nedostatne produkcije inzulina i posljedične hiperglikemije pri čemu dolazi do razvoja karakterističnih simptoma bolesti: poliurije, polidipsije, polifagije, slabosti i malaksalosti te gubitka tjelesne težine. Nerijetko se dijagnoza šećerne bolesti tipa 1 postavi tek po razvoju akutnih i životno ugrožavajućih komplikacija šećerne bolesti, poput hipoglikemije, dijabetičke ketoacidoze i drugih (43).

1.7. Komplikacije hiperglikemije i šećerne bolesti

Povećana razina glukoze u krvi u šećernoj bolesti uzrokuje brojne komplikacije koje dijelimo na akutne i kronične. Akutne komplikacije šećerne bolesti su hitna, životno ugrožavajuća stanja koja zahtijevaju žurno liječenje, nerijetko i hospitalizaciju. U njih se ubrajaju hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje i laktacidoza. Kronične komplikacije šećerne bolesti se tijekom vremena javljaju u velikog broja bolesnika sa šećernom bolesti. S obzirom na visoku stopu morbiditeta i mortaliteta koju sa sobom nose, kronične komplikacije šećerne bolesti predstavljaju velik javnozdravstveni problem diljem svijeta (43). Kronične komplikacije šećerne bolesti nastaju kao posljedica oštećenja endotelnih stanica velikih ili malih krvnih žila te se sukladno tome mogu podijeliti na makrovaskularne i mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti (73). U mikrovaskularne komplikacije spadaju dijabetička retinopatija, dijabetička nefropatija i dijabetička neuropatija. S druge strane, makrovaskularne komplikacije šećerne bolesti očituju se zahvaćenošću velikih

krvnih žila poput aorte, karotidnih i vertebralnih arterija s posljedično razvijenom koronarnom ili cerebralnom arterijskom bolesti i velikim rizikom od razvoja srčanog infarkta i moždanog udara (74, 75).

1.7.1. Akutne komplikacije šećerne bolesti

U akutne komplikacije šećerne bolesti ubrajaju se hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza i hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje (76). Hipoglikemija je stanje karakterizirano smanjenom koncentracijom glukoze ispod 3,5 mmol/L u perifernoj krvi. Hipoglikemija se može razviti u svim tipovima šećerne bolesti, najčešće kao posljedica neadekvatne prehrane i fizičke aktivnosti te primjene inzulina ili određenih lijekova. Glavni simptomi hipoglikemije su ubrzan rad srca – tahikardija, ubrzano disanje, preznojavanje, konfuzija, razdražljivost, agresivnost te izražena glad, a ista može progredirati sve do ozbiljnijih poremećaja svijesti i kome (77). U liječenju blažih i umjerenih oblika hipoglikemije koriste se peroralni pripravci brzo apsorbirajućih ugljikohidrata, dok teži oblici praćeni poremećajima svijesti zahtijevaju intravensku primjenu glukoze ili primjenu glukagona intramuskularno (78). Dijabetička ketoacidoza akutno je i životno ugrožavajuće stanje koje se javlja pretežno u šećernoj bolesti tipa 1. Nastaje zbog apsolutnog manjka inzulina pri čemu dolazi do prekomjerne razgradnje masti tj. lipolize s oslobađanjem velike količine slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline potom ubrzanim procesom β -oksidacije u jetri dovode do nastanka ketonskih tijela s posljedičnom ketoacidozom (40). Za razvoj dijabetičke ketoacidoze nerijetko je potrebna prisutnost i različitih okidača poput infekcija, neadekvatne primjene inzulina, primjene glukokortikoida i slično. Dijabetička ketoacidoza je karakterizirana izraženom hiperglikemijom, acidemijom i ketonemijom. Najčešće se manifestira bolovima u trbuhu, mučninom, dubokim i ubrzanim disanjem – Kussmalovim disanjem, karakterističnim zadahom po acetonu, slabošću, konfuzijom i poremećajima svijesti koji nastaju kao posljedica razvijenog moždanog edema (79). Zbog svega navedenog, kao i zbog relativno visoke smrtnosti koja iznosi od 1 do 5 %, bolesnici s dijabetičkom ketoacidozom zahtijevaju žurnu hospitalizaciju u jedinici intenzivnog liječenja radi kontinuirane primjene inzulina i izotoničnih otopina uz kontinuirano praćenje vitalnih funkcija (76, 80). Hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje akutna je komplikacija šećerne bolesti, i to najčešće šećerne bolesti tipa 2. Karakterizirana je izrazito visokim vrijednostima glukoze (glukoza u krvi > 30 mmol/L) uz povećanu osmolarnost plazme (osmolarnost > 320 mOsm/kg), a bez razvijene značajne ketoacidoze (pH $> 7,3$) (81). Klinički znakovi ovog

stanja uključuju prvenstveno znakove dehidracije, poput slabosti i malaksalosti, mišićnih grčeva, oslabljenog vida i različitih stupnjeva poremećaja svijesti. Također, hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje prati visok rizik razvoja komplikacija poput moždanog udara, rabdmiolize, diseminirane intravaskularne koagulacije, okluzije mezenterijalne arterije i drugih (82). Posljedično tome, hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje u odnosu na dijabetičku ketoacidozu prati i veća smrtnost od gotovo 10 - 15 %. U liječenju ovog stanja ključna je adekvatna nadoknada tekućine i elektrolita uz primjenu antibiotske terapije i niskomolekulskog heparina radi prevencije pratećih tromboembolijskih incidenata (76, 80, 81).

1.7.2. Kronične komplikacije šećerne bolesti

Svi oblici šećerne bolesti nose rizik razvoja kroničnih komplikacija koje se najčešće javljaju 10 - 20 godina nakon početka šećerne bolesti. Ipak, ponekad kronične komplikacije šećerne bolesti mogu biti i prvi simptom kod bolesnika s do tada neprepoznom šećernom bolesti (43). Šećerna bolest udvostručuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti te su upravo one uzrok smrtnosti u čak 75 % bolesnika sa DM (83). Osim koronarne arterijske bolesti, u skupinu makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti spada i cerebrovaskularna bolest s posljedičnim tranzitornim ishemijskim atakima ili cerebrovaskularnim inzultima te periferna arterijska bolest (84). Mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti očituju se najčešće zahvaćenošću mrežnice, perifernih živaca i bubrega, a nastaju kao posljedica oštećenja endotela malih krvnih žila. U dijabetičkoj retinopatiji zbog oštećenja endotelne stanice krvnih žila mrežnice dolazi do postupnog slabljenja vida sve do sljepoće. Štoviše, dijabetička retinopatija glavni je uzrok sljepoće u razvijenim zemljama (74, 85). Šećerna bolest povećava rizik i od razvoja glaukoma i katarakte, stoga bolesnici sa šećernom bolesti moraju provoditi redovite oftalmološke preglede, optimalno jednom godišnje (85). Oštećenjem malih krvnih žila perifernih živaca dolazi do razvoja dijabetičke neuropatije kao najčešće mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti koja se razvija u gotovo polovici bolesnika sa šećernom bolesti. Ista se može manifestirati na više načina: proksimalnom dijabetičkom neuropatijom, autonomnom neuropatijom, gastroparezom te razvojem dijabetičkih ulkusa i dijabetičkog stopala koji nerijetko zahtijevaju amputacije zahvaćenih udova (86). Također, šećerna bolest se dovodi u vezu i sa slabljenjem kognitivne funkcije te se kod bolesnika sa šećernom bolesti bilježi za 1,2 - 1,5 puta izraženiji pad kognitivnih funkcija u odnosu na pojedince koji ne boluju od šećerne bolesti (87).

1.8. Dijabetička bolest bubrega

Dijabetička bolest bubrega (*engl. diabetic kidney disease, DKD*) je kronična mikrovaskularna komplikacija šećerne bolesti koja se očituje poremećajem strukture bubrega i posljedičnim slabljenjem bubrežne funkcije (88). Javlja se u približno 40 % dijabetičara tijekom vremena, podjednako u tipu 1 i tipu 2 šećerne bolesti. Dijabetička bolest bubrega vodeći je uzrok kronične bubrežne bolesti u razvijenim zemljama, koja u svojim završnim stadijima zahtijeva različite komplicirane modalitete nadomjesnog bubrežnog liječenja poput hemodijalize i peritonealne dijalize, a u konačnici nerijetko i transplantaciju bubrega. Navedeno značajno povećava stopu morbiditeta i mortaliteta ovih bolesnika, narušava njihovu kvalitetu života, a isto neminovno utječe i na socio-ekonomsku sliku zahvaćenih zemalja (89).

1.8.1. Klinička slika, diferencijalna dijagnoza i dijagnostički postupci dijabetičke bolesti bubrega

Prvi klinički znakovi dijabetičke bubrežne bolesti javljaju se najranije 5 – 10 godina od početka šećerne bolesti (88). Najčešći klinički znak je nikturija – učestalo noćno mokrenje, a drugi simptomi uključuju slabost, loše opće osjećanje, glavobolju, mučninu, povraćanje, gubitak apetita, svrbež kože, oticanje donjih udova i druge (90). Glavni dijagnostički kriterij za postavljanje dijagnoze dijabetičke bubrežne bolesti predstavlja mikroalbuminurija, tj. nalaz povećane razine albumina u mokraći u rasponu 30 – 300 mg/24h. Mikroalbuminurija nastaje zbog oštećenja i povećanja permeabilnosti glomerularne bazalne membrane, nerijetko uz razvijenu arterijsku hipertenziju i zabilježen pad brzine glomerularne filtracije $< 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ tijekom vremena (91). S obzirom na moguć indolentan tijek bolesti u početnom razdoblju, bolesnicima koji boluju od šećerne bolesti preporučuju se redovite godišnje kontrole bubrežne funkcije i razine albumina u urinu, i to bolesnicima s tipom 2 šećerne bolesti odmah po postavljanju dijagnoze, a bolesnicima s tipom 1 šećerne bolesti počevši od 5 godina od dijagnosticiranja iste (90). Unatoč tome što se albuminurija danas smatra zlatnim standardom za postavljanje dijagnoze dijabetičke bubrežne bolesti, ista ima ograničenu osjetljivost s obzirom da nemali broj bolesnika s razvijenom dijabetičkom bubrežnom bolesti ima prisutnu glomerulosklozu sa zabilježenim značajnim padom brzine glomerularne filtracije i bubrežne funkcije, a bez razvoja značajne albuminurije (92). Zbog navedenog se dodatno nameće potreba provođenja daljnjih istraživanja s ciljem detekcije novih molekula i biomarkera radi

pravovremenog uspostavljanja dijagnoze dijabetičke bolesti bubrega kod svih bolesnika. Ozbiljniji klinički simptomi nastaju u slučaju razvoja nefrotskog sindroma kojeg karakterizira masivna proteinurija $> 3,5 \text{ g/24h}$ s razvojem hipoproteinemije i hipoalbuminemije, izraženih perifernih edema, hiperkolesterolemije i drugih (93). Osim navedenih laboratorijskih parametara, s ciljem diferencijalne dijagnoze potencijalnih drugih uzroka slabljenja bubrežne funkcije poput nefrolitijaze, opstrukcije kanalnog sustava bubrega, urinarnih infekcija, policistične bubrežne bolesti i drugih, potrebno je učiniti i ehosonografski pregled mokraćnog sustava, a u određenom broju slučajeva i biopsiju bubrega (94). Dijabetička bubrežna bolest se može, sukladno histopatološkim promjenama nađenim u biopsijskim uzorcima tkiva bubrega, klasificirati u 4 stadija, gdje 4. stadij karakterizira nalaz nodularne glomeruloskleroze u više od 50 % glomerula (95). Ipak, važnija je klinička klasifikacija bolesti ovisno o razini serumskog kreatinina i brzine glomerularne filtracije na 5 stadija koja odgovara klasifikaciji svakog kroničnog bubrežnog popuštanja (27).

1.8.2. Liječenje dijabetičke bolesti bubrega

Glavni cilj liječenja dijabetičkih bubrežnih komplikacija je sprječavanje progresije bubrežnog oštećenja do završnih stadija kronične bubrežne bolesti. Trenutno liječenje dijabetičke bolesti bubrega uključuje smanjenje kardiovaskularnog rizika, kontrolu arterijskog krvnog tlaka i glikemije te inhibiciju renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (94). S obzirom da šećerna bolest značajno povećava kardiovaskularni rizik te da isti djeluje kao neovisan čimbenik rizika za razvoj bubrežnog oštećenja, nužno je u liječenju DKD-a provoditi mjere s ciljem smanjenja kardiovaskularnog rizika. Navedene mjere uključuju prestanak pušenja, adekvatnu fizičku aktivnost i zdravu prehranu te kontrolu hiperlipidemije i hiperkolesterolemije u čiju svrhu se kod bubrežnih bolesnika koristi prvenstveno atorvastatin s obzirom da za isti nije potrebna korekcija doze sukladno razini glomerularne filtracije (47, 96). Također, i visoke vrijednosti arterijskog krvnog tlaka dovode do pogoršanja albuminurije i progresije dijabetičke bubrežne bolesti zbog čega se svim bolesnicima sa šećernom bolesti preporučuje striktna kontrola i održavanje arterijskog krvnog tlaka u vrijednosti ispod 125 – 130/80 mmHg. Među svim dostupnim antihipertenzivima, kod bubrežnih bolesnika najčešće se primjenjuju inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima ili blokatori angiotenzin II receptora (90). Osim navedenih, s ciljem blokiranja RAAS sustava koji ima ključnu ulogu u razvoju dijabetičkih bubrežnih komplikacija, koriste se i direktni reninski inhibitori te mineralokortikoidni antagonisti. Iako se istodobnom primjenom više lijekova iz ove skupine postiže učinkovitija supresija RAAS sustava s

posljedično boljom kontrolom proteinurije, rizik od mogućih nuspojava i komplikacija, poput hiperkalijemije i akutnog oštećenja bubrega, nadmašuje potencijalnu korist. Stoga se bolesnicima koji boluju od šećerne bolesti i imaju razvijenu arterijsku hipertenziju ili mikroalbuminuriju te druge znakove dijabetičke bubrežne bolesti preporučuje primjena samo jednog od lijekova iz ove skupine (97). Noviji lijekovi za liječenje šećerne bolesti koji pokazuju protektivan učinak na očuvanje bubrežne funkcije i razvoj proteinurije su SGLT 2 inhibitori koji imaju i povoljne kardiovaskularne učinke, kao i GLP-1 agonisti i DPP-4 inhibitori (98). Unatoč tome, trenutno u liječenju dijabetičkih bubrežnih komplikacija nema dostupnog adekvatnog terapijskog tretmana koji bi u potpunosti i kod svih bolesnika spriječio razvoj ili progresiju dijabetičke bubrežne bolesti do završnih stadija kroničnog bubrežnog zatajenja.

1.8.3. Patofiziološki mehanizmi i morfološke karakteristike dijabetičke bolesti bubrega

Dugotrajna neregulirana šećerna bolest posljedično hiperglikemiji i njenim posljedicama očituje se prvenstveno hemodinamskim poremećajem na razini malih krvnih žila bubrega s vazodilatacijom aferentne i vazokonstrikcijom eferentne arteriole. Navedene promjene dovode do porasta intraglomerularnog tlaka s glomerularnom kapilarnom hipertenzijom i hiperfiltracijom (99). Uz porast intraglomerularnog tlaka, aktivacija renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava u šećernoj bolesti dovodi i do porasta sistemskog arterijskog tlaka. Osim hemodinamskih promjena, u dijabetičkoj bolesti bubrega nalazimo i brojne metaboličke promjene koje prvenstveno nastaju kao posljedica stvaranja tzv. završnih produkata glikacije (*engl. advanced glycation end products, AGE*) (100). Završni produkti glikacije su kemijska skupina molekula koje nastaju neenzimatskom reakcijom glukoze i amino-skupina proteina, lipida i nukleinskih kiselina, najčešće lizina i arginina. AGE produkti talože se na bjelančevine endotela krvnih žila s posljedičnim razvojem niza kroničnih komplikacija šećerne bolesti, uključujući kardiovaskularnu bolest i dijabetičku bolest bubrega (101). Također, vezivanjem AGE produkata na njihov receptor (*engl. receptor of advanced glycation end products, RAGE*) dolazi do pojačane produkcije reaktivnih kisikovih radikala i stimulacije niza intracelularnih molekula poput protein kinaze C i aktivacije transformirajućeg čimbenika rasta β (*engl. transforming growth factor β , TGF- β*) i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (*engl. vascular endothelial growth factor, VEGF*) (102). Ovi čimbenici, zajedno s hemodinamskim promjenama, dovode do ozljede podocita, oksidativnog stresa, upale i posljedične fibroze (99). Najtipičnija morfološka značajka povezana s dijabetičkom bolesti bubrega je zadebljanje glomerularne bazalne membrane s posljedičnom disfunkcijom

glomerula i mikroalbuminurijom, mezangijalnom ekspanzijom, glomerularnom sklerozom, skraćivanjem podocita, promjenom glikokaliksa itd (95). Porast broja mezangijskih stanica i posljedična ekspanzija mezangija dovode do formiranja karakterističnih Kimmelsteil-Wilsonovih čvorića koji se mogu naći u 40 – 50 % bolesnika s razvijenom dijabetičkom bolesti bubrega s mogućim razvojem dijabetičke nodularne glomeruloskleroze (103). Osim promjena na razini glomerula, u dijabetičkoj bolesti bubrega dolazi i do značajnih promjena tubulointercicija. Štoviše, nedavna otkrića upućuju da bi proksimalni zavijeni kanalići mogli biti početno mjesto oštećenja i potencijalno novo mjesto terapijskog djelovanja u dijabetičkoj bolesti bubrega, dok su neke studije ukazale na važnost promjena u tubularnim epitelnim stanicama distalnih zavijenih kanalića u patofiziologiji iste (104, 105). Razvoj kroničnih dijabetičkih komplikacija složeni je proces koji, između ostalog, uključuje modifikaciju sinteze dušikovog oksida i oslabljeni sustav popravljanja oštećene i pogrešno sparene deoksiribonukleinske kiseline (*engl. deoxyribonucleic acid, DNA*). Oksidativni stres putem pretjerane proizvodnje superoksidnog iona i drugih reaktivnih vrsta kisika (*engl. reactive oxygen species, ROS*) u šećernoj bolesti uzrokuje mutacije stanične i mitohondrijske DNA (106). Reaktivni kisikovi radikali su molekule koje sadrže kisik i nesporeni elektron zbog kojeg se smatraju slobodnim radikalima. ROS djeluju na način da oksidiraju DNA, proteine, lipide i ugljikohidrate čime stvaraju oksidativni stres koji je karakteriziran oštećenjem mitohondrija i stanica s indukcijom programirane stanične smrti stanica tj. apoptoze (107). Mitohondrijski posredovana stanična smrt se odvija i aktivacijom kaspaze 3 i endonukleaze, oslobađanjem citokroma C te slabom energetsom opskrbom zbog nedostatne produkcije adenozin trifosfata (*engl. adenosine triphosphate, ATP*) (108). Također, oksidativni stres dovodi do aktivacije jezgrinog enzima poli-ADP ribozne polimeraze-1 (*engl. poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1*) koji usporava glikolizu, transport elektrona i stvaranje ATP-a, a ima ulogu i u detekciji oštećenja i pogrešno sparene DNA, aktivaciji transkripcije upalnih i drugih čimbenika te indukciji apoptoze. PARP-1 se povezuje i s oštećenjima endotelnih stanica krvnih žila s posljedičnim razvojem makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti, uključujući dijabetičku retinopatiju i dijabetičku bolest bubrega (109). Do sada poznati i snažni stanični antioksidansi koji umanjuju posljedice oksidativnog stresa su glutation, superoksid dismutaza i katalaza. Terapijska uloga antioksidansa s ciljem sprječavanja oksidativnog stresa i njegovih posljedica te patoloških stanja koja se dovode u vezu s istim predmet je brojnih istraživanja (110). Između ostalog, oksidativni stres putem oštećenja stanične i mitohondrijske DNA uzrokuje genomsku nestabilnost uz veći rizik započinjanja i napredovanja karcinogeneze (111). Potpuno razumijevanje molekularnih i

patogenetskih mehanizama u razvoju dijabetičke bubrežne bolesti nužno je jer je dokazana snažna veza između šećerne bolesti i karcinoma bubrega (112-115). Uz to, jedno nedavno istraživanje utvrdilo je prisutnost mutacija više onkogena i tumor supresorskih gena u kori bubrega dijabetičara (104). Navedeni rezultati dodatno su naglasili nužnost provođenja dodatnih istraživanja o izražaju i funkciji različitih drugih gena koji sudjeluju u procesu karcinogeneze kod dijabetičara, uključujući gene za popravak pogrešno sparene DNA.

1.9. Geni za popravak pogrešno sparene DNA

Geni za popravak pogrešno sparene DNA (*engl. mismatch repair genes, MMR*) sudjeluju u održavanju homeostaze DNA i genomske stabilnosti, a čine u eukariota visoko konzerviran sustav od osam MMR gena koji koordinirano djeluju u nekoliko koraka kako bi pokrenuli popravak pogrešno sparene DNA (116). Dvije su osnovne skupine gena za popravak pogrešno sparene DNA: MutS homolozi (prema bakteriji *Escherichia coli* u kojoj su prvotno izolirani) u koje spadaju MutS protein homolog 2 (*engl. MutS protein homolog 2, MSH2*), MutS protein homolog 3 (*engl. MutS protein homolog 3, MSH3*), MutS protein homolog 5 (*engl. MutS protein homolog 5, MSH5*) i MutS protein homolog 6 (*engl. MutS protein homolog 6, MSH6*) te MutL homolozi u koje se ubrajaju MutL protein homolog 1 (*engl. MutL protein homolog 1, MLH1*), MutL protein homolog 3 (*engl. MutL protein homolog 3, MLH3*), post-mejotički segregacijski protein 1 (*engl. post-meiotic segregation protein 1, PMS1*) i post-mejotički segregacijski protein 2 (*engl. post-meiotic segregation protein 2, PMS2*). Glavna uloga MMR gena je prepoznavanje i popravak pogrešno sparenih baza/nukleotida i malih insercijskih/delecijskih pogrešaka koje se događaju prilikom replikacije DNA (117). Naime, ključnu ulogu u prepoznavanju pogrešno sparene DNA imaju MutS homolozi, točnije MutS protein homolog 2 koji, da bi izvršio svoju funkciju kao MMR gen, čini heterodimer zajedno s MSH6 ili MSH3. S obzirom da je u ljudskom organizmu MSH6 izražen 10 puta više u odnosu na MSH3, upravo heterodimer MutS α kao heterodimer između MSH2 i MSH6 u najvećem broju slučajeva prvo prepoznaje grešku. Osim toga, MutS α je zadužen primarno za popravak pogrešno sparenih baza/nukleotida i malih dinukleotidnih insercijskih/delecijskih pogrešaka sastavljenih od 1 – 2 nukleotida (118). S druge strane, MutS β , heterodimer sastavljen od MSH2 i MSH3, zaslužan je za prepoznavanje većih insercijskih/delecijskih pogrešaka sastavljenih od najviše 13 nukleotida koje se događaju u mikrosatelitima kao repetitivnim sekvencama DNA sastavljenim od 1 – 5 nukleotida koji se pružaju duž čitavog genoma (119). Kristalna struktura i mehanizam djelovanja MutS α i MutS β heterodimera nisu u potpunosti razjašnjeni. Poznato je da navedeni proteini nakon prepoznavanja

i vezivanja za pogrešno sparni segment DNA djeluju kao ATP-aze koje ovisno o promjeni adenozin difosfata (*engl. adenosine diphosphate, ADP*) u ATP doživljavaju konformacijsku promjenu te poprimaju ulogu takozvane „klizne stezaljke“ (*engl. sliding clamp*). Navedeno im omogućuje lateralno pomicanje s početnog mjesta oštećenja DNA duž lanca DNA u oba smjera, a nakon rekrutacije ostalih ključnih gena u procesu popravka pogrešno sparnog DNA, s obzirom da navedeni MutS proteini nisu u mogućnosti prepoznati koji od lanaca DNA je osnovni to jest parentalni, a koji nositelj novosintetiziran (120). MutS α/β heterodimer potom aktivira drugi heterodimer između MLH1 i PMS2, MLH3 ili PMS3 te u konačnici ovaj proteinski kompleks formiran od dva seta heterodimera omogućuje pokretanje popravka pogrešno sparnog DNA (116). MutL α kao heterodimer između MLH1 i PMS2 dislocira DNA polimerazu i proliferirajući stanični jezgri antigen (*engl. proliferating cell nuclear antigen, PCNA*) s novosintetiziranog lanca DNA i dovodi do aktivacije enzima DNA helikaze, egzonukleaze 1 (*engl. exonuclease 1, Exo1*) i drugih proteina potrebnih za razdvajanje dvolančane molekule DNA i eksciziju pogrešno sintetiziranih nukleotida (121). Nakon ekscizije odgovarajućeg dijela lanca DNA, dolazi do aktivacije DNA polimeraze i DNA ligaze koje vrše ponovnu sintezu lanca DNA s odgovarajućim bazama/nukleotidima. Točna uloga MutL β kao heterodimera između MLH1 i PMS1 nije u cijelosti poznata, dok MutL γ kao heterodimer između MLH1 i MLH3 ima ključnu ulogu u mejozičkoj rekombinaciji (122). MMR geni uključeni su, osim u popravak vezan uz replikaciju i transkripciju različitih oblika oštećenja DNA, i u brojne druge biološke procese kao što su mitotska i mejozička rekombinacija, kontrola staničnog ciklusa i indukcija programirane stanične smrti – apoptoze, somatske hipermutacije imunoglobulinskih gena, ekspanzija repetitivnih trinukleotidnih ponavljanja u mikrosatelitima i drugo (117). Posljedično tome, geni za popravak pogrešno sparnog DNA su, sukladno svojoj primarnoj ulozi u popravku replikacijskih oštećenja DNA, slabo izraženi u većini stanica ljudskog organizma, osim u visoko proliferativnim tkivima i stanicama, gdje je stopa navedenih oštećenja ujedno i veća (123). Oštećen sustav za popravak pogrešno sparnog DNA uzrokovan genskom mutacijom ili hipermetilacijom njihovog promotorskog mjesta dovodi do mikrosatelitske nestabilnosti i veće učestalosti spontanih mutacija (117). Mikrosatelitna nestabilnost (*engl. microsatellite instability, MSI*) kao nestabilnost kratkih repetitivnih tandemskih sekvenci DNA nastaje kao posljedica disfunkcionalnosti MMR sustava, što u konačnici dovodi do izraženije mutageneze i karcinogeneze te razvoja različitih zloćudnih tumora. Upravo se mikrosatelitna nestabilnost koristi kao poseban biomarker tzv. „mutacijskog fenotipa“ kod više nasljednih i sporadičnih tumora, uključujući nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (*engl. hereditary non-polyposis colorectal carcinoma, HNPCC*) u Lynchovom sindromu (124). Lynchov sindrom je autosomno dominantna nasljedna bolest koju karakterizira povećan (gotovo 80 %-ni) rizik od

ranog razvoja nepolipoznog kolorektalnog karcinoma, najčešće prije 45. godine života. Lynchov sindrom karakterizira i povećan rizik od razvoja drugih izvancrijevnih tumora, uključujući karcinom jajnika, endometrija, želuca, hepatobilijarnog sustava, bubrega i drugih (125). Lynchov sindrom čini 3 – 5 % svih karcinoma debelog crijeva. Otprilike 90 % kolorektalnih karcinoma u Lynchovom sindromu izražava mikrosatelitsku nestabilnost koja nastaje kao posljedica genskih mutacija gena za popravak pogrešno sparene DNA, u najvećem broju slučajeva MLH1 i MSH2 te nešto rjeđe MSH6 i PMS2 (126). Ista se može naći i u 15 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva. U tom slučaju MSI ne nastaje kao posljedica genske mutacije već kao posljedica različitih epigenetskih i posttranskripcijskih promjena koje u konačnici dovode do smanjene ili neadekvatne aktivnosti ovog sustava, poput hipermetilacije promotorskog mjesta MMR gena (127). Inaktiviranje ovih gena je, između ostalog, snažno povezano i s različitim drugim vrstama tumora, uključujući nasljedni i sporadični karcinom bubrega (128, 129). Karcinom bubrega svijetlih stanica, kao treći po učestalosti karcinom mokraćnog sustava s najvećim mortalitetom, čini 4 % od svih zloćudnih bolesti (130). Utvrđena je mikrosatelitna nestabilnost u otprilike 30 % slučajeva karcinoma bubrega, sa zabilježenim gubitkom MLH1 u 10 %, a MSH2 u 18 % slučajeva, dok je istovremeni gubitak MLH1 i MSH2 znatno rjeđi (131). Također, nađena je snažna veza između gubitka MLH1 i MSH2 i nižih gradusa tumora, što iste čini pozitivnim prognostičkim čimbenikom za karcinom bubrega (129). Štoviše, utvrđena je povezanost između smanjene aktivnosti MMR sustava i rezistencije tumorskih stanica na različite alkilirajuće agense i citostatike poput cisplatina, 5-fluorouracila i slične, što liječenje tumora s MMR deficijencijom čini dodatno izazovnim (132, 133). Do sada su geni za popravak pogrešno sparene DNA analizirani pretežno u kontekstu karcinogeneze, a u sadašnjoj literaturi nedostaju jasni dokazi o izražaju i funkciji MMR gena u različitim drugim patološkim stanjima, uključujući šećernu bolest.

1.9.1. MutL protein homolog 1 – MLH1

MutL protein homolog 1, kodiran genom MLH1 na 3. kromosomu, jedan je od ključnih proteina za popravak pogrešno sparene DNA. S obzirom da je mutacija MLH1 gena nađena u otprilike 30 % slučajeva Lynchovog sindroma, utvrđeno je da bi MLH1 mogao biti koristan kao poseban biomarker za ranu dijagnozu nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma u Lynchovom sindromu (134). Također, MLH1 gen se dovodi u vezu i s drugim karcinomskim sindromima, poput Turcotovog sindroma kojeg karakterizira rani razvoj kolorektalnog karcinoma (HNPCC) i zloćudnih tumora središnjeg živčanog sustava, najčešće meduloblastoma i malignog

glioma (135). Što se sporadičnih tumora tiče, poremećaj MMR sustava koji se nalazi u 13 – 15 % sporadičnih kolorektalnih karcinoma značajno češće je posljedica deficijencije MLH1 negoli drugih gena za popravak pogrešno sparene DNA (127). Također, smanjen izražaj MLH1 nađen je u velikom postotku slučajeva i drugih karcinoma, poput nesitnostaničnog karcinoma pluća, karcinoma jednjaka, želuca te skvamoznih karcinoma glave i vrata (136, 137). Za razliku od Lynchovog sindroma gdje je smanjen izražaj MLH1 posljedica genske mutacije, u sporadičnim zloćudnim tumorima isti je uglavnom posljedica jedne ili više epigenetskih alteracija koje smanjuju ili u potpunosti utišavaju izražaj MLH1 gena, poput hipermetilacije promotorskog mjesta MLH1 gena ili pojačane ekspresije miR-155 mikroRNA koja u tumorskim stanicama kolorektalnog karcinoma pokazuje inverznu korelaciju u odnosu na izražaj MLH1 i MSH2 (138). Osim uloge u popravku pogrešno sparene DNA, MLH1 zajedno sa MLH3 formira heterodimer MutL γ koji ima ključnu ulogu u mejotičkoj rekombinaciji gdje omogućuje napredovanje oocite u metafazu II mejoze. Posljedično tome, i muške i ženske jedinke s mutiranim MLH1 genom i razvijenim MLH1 (-/-) genotipom su sterilne (122). Što se šećerne bolesti tiče, samo je jedno istraživanje do sada ispitalo razinu anti-MLH1 protutijela u šećernoj bolesti. Naime, Muller i suradnici dokazali su povećanu razinu anti-MLH1 protutijela u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 čime bi se MLH1 mogao smatrati novim „malim“ autoantigenom u šećernoj bolesti, uz utvrđenu i njegovu povezanost s HLA-DRB1*04 antigenom (139). Od svih komplikacija šećerne bolesti, uloga MLH1 istražena je samo u proliferativnoj dijabetičkoj retinopatiji koja nastaje primarno kao posljedica oštećenja mitohondrijske DNA. U jednom istraživanju, pri izloženosti humanih retinalnih endotelnih stanica različitim koncentracijama glukoze, nađen je značajno manji izražaj MLH1 u stanicama mrežnice u uvjetima hiperglikemije koji nastaje kao posljedica hipermetilacije promotorskog mjesta MLH1 (140). Druga skupina istraživača utvrdila je sličan obrazac izražaja MLH1 i MSH2 gena u stanicama mrežnice streptozotocin-induciranih dijabetičkih štakora (141). Također, ispitan je i status metilacije mitohondrijske DNA u krvi pojedinaca sa šećernom bolesti i razvijenom proliferativnom dijabetičkom retinopatijom (142).

1.9.2. MutS protein homolog 2 – MSH2

Mut S protein homolog 2, kao jedan od MutS proteina sustava za popravak pogrešno sparene DNA koji ima ključnu ulogu u prepoznavanju pogrešno sparenih nukleotida i insercijskih/delecijjskih pogrešaka, kodiran je genom MSH2 lociranim na 2. kromosomu (116). MSH2 djeluje i kao tumor supresorski gen, a sudjeluje u mnogim različitim oblicima popravka DNA, uključujući popravak ekscizije baze, homolognu rekombinaciju i popravak vezan uz

transkripciju (117). Od svih gena za popravak pogrešno sparene DNA, genske mutacije MSH2 su, uz mutacije MLH1, glavni uzrok Lynchovog sindroma (125). Štoviše, jedna od 144 do sada pronađene mutacije MSH2 gena čini otprilike 40 % genetskih alteracija pronađenih u Lynchovom sindromu (143). Slično MLH1, u uzorcima više sporadičnih zloćudnih tumora nađen je smanjen izražaj MSH2 koji nastaje posljedično hipermetilaciji promotorskog mjesta MSH2 gena. Epigenetski smanjen izražaj MSH2 gena pronađen je u otprilike 30 % slučajeva nesitnostaničnog karcinoma pluća, 45 % slučajeva prve manifestacije i čak 86 % slučajeva relapsa akutne limfoblastične leukemije, a isti se dovodi u vezu i s razvojem karcinoma jednjaka, debelog crijeva i hepatocelularnog karcinoma (144, 145). Također, i veliki postotak sporadičnih karcinoma bubrega pokazuje pojačanu metilaciju promotorskog mjesta MSH2 gena te bi se navedena hipermetilacija MSH2 gena mogla koristiti kao prediktivan biomarker i prognostički čimbenik karcinoma bubrega (146). U kontekstu šećerne bolesti, pronađen je povećan izražaj MSH2 gena kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 i razvijenom koronarnom arterijskom bolesti (147). S druge strane, kako je ranije navedeno, utvrđena je smanjena razina MSH2 u stanicama mrežnice u proliferativnoj dijabetičkoj retinopatiji, ali bez zabilježenog protektivnog učinka porasta razine MSH2 u retinalnim stanicama na razinu mitohondrijskih oštećenja kao i na progresiju dijabetičke retinopatije (141). Štoviše, opisana je uloga MSH2 ne samo u razvoju makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti, već i u otežanom oporavku kod već razvijenih dijabetičkih komplikacija (148).

1.9.3. Post-mejotički segregacijski protein 2 - PMS2

Post-mejotički segregacijski protein 2, kao jedan od proteina sustava za popravak pogrešno sparene DNA je enzim s latentnom endonukleaznom aktivnošću koja se izvodi uvođenjem zareza u diskontinuirani DNA lanac. Kodiran je PMS2 genom na 7. kromosomu (149). PMS2, uz kompeticiju s MLH3 i PMS1, stupa u interakciju s MLH1 formirajući heterodimer MutL α koji ima ključnu ulogu u rekrutaciji ostalih ključnih enzima u procesu popravka pogrešno sintetiziranih nukleotida (121). Posljedično tome, gubitak PMS2 ne dovodi nužno do mikrosatelitne nestabilnosti s obzirom da MLH1 može ostvariti svoju funkciju formirajući heterodimer i s MLH3 ili PMS1. Također, PMS2 ima važnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa (150). Naime, PMS2 modulira protektivan odgovor na oštećenje DNA neovisno o izražaju p53 i djeluje kao pozitivni medijator staničnog preživljavanja u stanicama s defektnim p53 (151). Štoviše, PMS2 i MLH1 mogu zaštititi stanice od stanične smrti zaustavljajući p73-posredovanu apoptozu (152). Defekti ovog gena dovode se u vezu s HNPCC-om u Lynchovom

sindromu, Turcotovim sindromom i supratentorijalnim primitivnim neuroektodermalnim tumorima. Također, mutacije u promotorskoj regiji PMS2 visoko su specifične za više skupina sporadičnih zloćudnih tumora, uključujući limfome, sarkome i melanome (126, 153). Osim navedenog, PMS2 ima veliku važnost i u spermatogenezi s obzirom da su jedinke s PMS2 (-/-) genotipom sterilne (154). U ljudskom organizmu PMS2 je pretežno slabo eksprimiran u većini tkiva osim u staničnoj jezgri enterocita koloničnih kripti gdje je pojačano eksprimiran sukladno povećanoj stopi popravka DNA koja se odvija svakodnevno u tim stanicama. Posljedično tome, gotovo 88 % tumorskih stanica karcinoma debelog crijeva pokazuje smanjen ili negativan izražaj PMS2 koji nastaje kao posljedica različitih epigenetskih promjena (155). Skupina japanskih istraživača utvrdila je da šećerna bolest i displipidemija značajno smanjuju izražaj PMS2 u stanicama pankreatičnog duktalnog adenokarcinoma s inverznom korelacijom izražaja PMS2 prema stupnju oksidativnog stresa (156). S druge strane, izražaj PMS2 u različitim patologijama bubrežnog tkiva ispitan je samo u jednom istraživanju. Karin Bolin i suradnici detektirali su 6 novih gena povezanih s razvojem lupusnog nefritisa kao nefritisa koji se javlja u sklopu sistemskog eritematoznog lupusa, uključujući PMS2 gen (157). Unatoč njegovoj značajnoj ulozi u regulaciji karcinogeneze i snažnoj povezanosti između šećerne bolesti i bubrežnog karcinoma, u trenutnoj literaturi nema dostupnih istraživanja o izražaju i funkciji PMS2 gena u patofiziologiji dijabetičke bolesti bubrega.

1.9.4. Membranski protein H2A histon X - γ H2AFX

Membranski protein H2A histon X (*engl. membrane protein H2A histone X, H2AFX*), jedan je od tri histonska proteina iz H2A obitelji histona koji čini otprilike 2 – 25 % od svih H2A proteina u kromatinu. H2AFX zajedno s drugim H2A histonskim proteinima kao i H2B, H3 i H4 proteinima pridonosi stvaranju nukleosoma i pregradnji kromatina (158). Također, H2AFX je ključni histon koji sudjeluje u otkrivanju i popravljanju dvolančanih prekida (*engl. double strand breaks, DSB*) DNA (159). Naime, već unutar 1 – 3 minute od nastupa dvolančanog prekida DNA dolazi do fosforilacije H2AFX na serinskom-139 mjestu od strane ataksija-teleangiektazija mutirajućeg proteina (*engl. ataxia-teleangiectasia mutated protein, ATM*), ataksija-teleangiektazija RAD 3 povezanog proteina (*engl. ataxia-teleangiectasia RAD 3 related protein, ATR*) i protein kinaze ovisne o DNA (*DNA-dependent protein kinase, DNA-PK*). Navedene protein kinaze pripadaju fosfatidil-inozitol 3 obitelji serin-treonin protein kinaze (160). Fosforilacijom H2AFX nastaje njegov fosforilirani oblik (*engl. phosphorylated form of H2A histone family member X, γ H2AFX*) koji se već dugi niz godina koristi kao marker dvolančanih

prekida DNA u „in vitro“ uvjetima (161). Točna uloga γ H2AFX u popravku DNA još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da zbog navedene modifikacije njegove strukture dolazi do dekonenzacije DNA i otvaranja prostora za rekrutaciju čitavog niza drugih molekula potrebnih za popravak dvolančanih prekida DNA (158). Na fosforilirani oblik γ H2AFX veže se prvo protein 1 kontrolne točke oštećenja DNA (*engl. mediator of DNA damage checkpoint protein 1, MDC-1*). Potom se na MDC1- γ H2AFX kompleks vežu ubikvitin ligaze RNF 8 i RNF 168 koje u interakciji s CHD4 helikazom ubikvitiraju ostale komponente kromatina i vrše dekonenzaciju kromatina. Na MDC1- γ H2AFX modificirani kromatin vežu se protein osjetljivosti na rak dojke tip 1 (*engl. breast cancer type 1 susceptibility protein, BRCA 1*) i tumor supresorski p53-vezujući protein 1 (*engl. tumor suppressor p53-binding protein 1, 53BP1*) kao i drugi proteini koji u konačnici dovode do popravka dvolančanih prekida DNA (162). Osim toga, kao tumor supresorski gen, γ H2AFX štiti limfatičke B-stanice od maligne transformacije te je povezan s razvojem ne-Hodgkinovog limfoma, karcinoma bubrega i drugih zloćudnih tumora (163). Više istraživanja potvrdilo je značajno veći izražaj γ H2AFX u bubrežnom tkivu nakon izlaganja istog cisplatinu ili ionizirajućem zračenju, kao i u nizu bolesti bubrežnog parenhima poput autosomno dominantne adultne policistične bubrežne bolesti, unilateralne ureteralne opstrukcije i akutne ishemijsko-reperfuzijske ozljede bubrega (164-166). Također, utvrđeno je i da povećana razina γ H2AFX u glomerularnim endotelnim stanicama akumulacijom kolagena tipa VI inducira intraktabilnu glomerularnu fibrozu u bubrežnim alotransplantatima nakon transplantacije bubrega (167). Što se šećerne bolesti tiče, dokazan je povećan izražaj γ H2AFX kod adolescenata sa šećernom bolesti tipa 1, kao i u CD 117 + stanicama koštane srži streptozotocin-induciranih dijabetičkih miševa i endotelnim stanicama aorte dijabetičkih štakora, a sve kao odraz povećane razine nuklearnih oštećenja i dvolančanih prekida DNA koja nastaju u uvjetima hiperglikemije (168, 169). Štoviše, utvrđena je povećana razina γ H2AFX u glomerularnim endotelnim stanicama u uvjetima šećerne bolesti u dva neovisna istraživanja (170, 171). S druge strane, ni jedno istraživanje u trenutno dostupnoj literaturi nije ispitalo izražaj γ H2AFX u strukturama bubrežne kore pojedinačno, a samo je jedna studija do sada opisala promjene u bubrežnom izražaju γ H2AFX gena, mRNA i proteina na istom modelu streptozotocinom inducirane šećerne bolesti tipa 1 (172).

1.10. Epitelno-mezenhimalna tranzicija

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (*engl. epithelial-mesenchymal transition, EMT*) je složen i dinamičan proces u kojem dolazi do fenotipske transdiferencijacije epitelnih stanica u

stanice s mezenhimalnim fenotipom. Pri tome stanice gube svoju staničnu polarnost i adhezivnost, a dobivaju invazivne i migratorne karakteristike (173). Epitelno-mezenhimalna tranzicija je neophodna za niz razvojnih procesa, uključujući razvoj mezoderma i formaciju neurološke cijevi, a uključena je i u samu implantaciju embrija koja se događa nakon oplodnje kao i formiranje posteljice (174). Također, EMT ima ključnu ulogu u cijeljenju rana, razvoju fibroze organa i inicijaciji metastatskog procesa u diseminaciji zloćudnih tumora (175). Sukladno tome, na temelju njezine biološke uloge, epitelno-mezenhimalna tranzicija se dijeli na tri osnovna tipa: razvojni (tip 1), fibrozni (tip 2) i karcinomski tip (tip 3) (176). Gubitak E-kadherina i zonule-okludens kao epitelnih markera predstavlja ključan patofiziološki događaj i prvi korak u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije (177). Mnogi transkripcijski čimbenici poput transkripcijskog represora obitelji proteina cinkovog-prstena Snail 1 (*engl. Zinc-finger 1 protein family member Snail, Snail*), transkripcijskog represora obitelji proteina cinkovog-prstena Snail 2 (*engl. Zinc-finger 2 protein family member Snail, SLUG*) i drugih, mogu suprimirati transkripciju i ekspresiju E-kadherina i na taj način potaknuti EMT. Štoviše, poznato je da određeni patološki uvjeti poput hipoksije kao i nekolicina signalnih putova poput Wnt/ β -katenin, Notch i TGF- β signalnog puta mogu inducirati proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (173). Osim gubitka epitelnih markera, navedeni proces karakterizira stjecanje novih mezenhimalnih markera poput antigena glatkih mišića – α , N-kadherina, vimentina i fibronektina (177). Prema najnovijim saznanjima, epitelno-mezenhimalna tranzicija se dovodi u vezu i sa stečenom otpornosti na radioterapiju kao i na različite lijekove, u prvom redu kemoterapeutike i citostatike poput paklitaksela, doksorubicina i adriamicina (178, 179). S obzirom na to i da je indukcija epitelno-mezenhimalne tranzicije primarni mehanizam kojim epitelne tumorske stanice dobivaju maligne karakteristike koje promoviraju diseminaciju zloćudne bolesti, upravo je razvoj lijekova koji ciljaju ključne komponente u aktivaciji EMT procesa jedan od glavnih ciljeva farmakološke industrije i današnje medicine. U kliničkim istraživanjima je pokazana dobra učinkovitost nekoliko malih molekula koje inhibiraju TGF- β induciranu epitelno-mezenhimalnu tranziciju, poput silmitasertiba i galunisertiba za liječenje kolangiokarcinoma, hepatocelularnog karcinoma, karcinoma gušterače, malignog glioma i adenokarcinoma pluća (180, 181).

1.10.1. Epitelno-mezenhimalna tranzicija u tkivu bubrega

Bubrežna fibroza (glomeruloskleroza i tubulointersticijska fibroza) krajnji je i ireverzibilni stadij svake kronične bubrežne bolesti koju karakterizira prekomjerna akumulacija komponenti izvanstaničnog matriksa u glomerulima i bubrežnom intersticiju. Osim toga, u

tubulointersticijskoj fibrozi dolazi do izražene proliferacije fibroblasta i miofibroblasta i infiltracije intersticija upalnim stanicama s posljedičnom atrofijom tubularnih epitelnih stanica (182). U kratkotrajnom modelu fibroza djeluje kao adaptivni mehanizam s ciljem popravka oštećenog tkiva, no prolongacija iste nakon ozbiljnijeg ili ponavljano oštećenja tkiva dovodi do narušavanja strukture bubrežnog parenhima i poremećaja bubrežne funkcije (183). Djelomična epitelno-mezenhimalna tranzicija tubularnih epitelnih stanica je oblik EMT procesa u kojem tubularne stanice istovremeno izražavaju i mezenhimalne i epitelne markere te su sposobne proizvesti veliku količinu izvanstaničnog matriksa s posljedičnim narušavanjem normalne strukture bubrega. Djelomična epitelno-mezenhimalna tranzicija prepoznata je kao ključan patofiziološki mehanizam razvoja glomerularne i tubulointersticijske fibroze kod različitih oblika kronične bubrežne bolesti, uključujući dijabetičku bolest bubrega (184). Osim što povećava sposobnost produkcije proupalnih citokina i komponenti izvanstaničnog matriksa, parcijalna EMT tubularnih epitelnih stanica povećava i migracijski kapacitet tubularnih stanica kao i njihovu rezistenciju na apoptozu (185). Proces tubularne epitelno-mezenhimalne tranzicije posredovan je nizom parakrinih molekula i sofisticiranih unutarstaničnih signalnih putova. Vjeruje se da su razvojni putovi Wnt, Notch i TGF- β ključni u aktiviranju transkripcijskih faktora povezanih s EMT-om, kao što su Snail, SLUG i drugi, te se smatra da su upravo oni glavni regulatori aktivacije miofibroblasta s posljedičnom fibrozom bubrega (186). Ipak, potpuni molekularni i patogenetski mehanizmi na kojima se temelji uloga tubularnog EMT-a u ranoj dijabetičkoj nefropatiji i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.

1.10.2. Snail

Snail (SNAIL) je snažan transkripcijski čimbenik iz obitelji proteina cinkovog-prstena koji sudjeluje u brojnim biološkim procesima. Suprimirajući ekspresiju ektodermalnih gena Snail ima ključnu ulogu u formaciji mezoderma za vrijeme embriogeneze. Također sudjeluje u promoviranju tumorskog rasta, invazivnosti tumorskih stanica i diseminaciji zloćudnih epitelnih tumora (187). Vezujući se za tzv. E-box, promotorsku regiju E-kadherina, Snail vrši supresiju E-kadherina čime djeluje kao ključan regulator epitelno-mezenhimalne tranzicije (177). Poznato je da snail ima središnju funkciju u glomerularnoj i intersticijskoj fibrozi putem posredovanja EMT podocita i tubularnih epitelnih stanica. Utvrđena je povezanost između povećane ekspresije Snaila i raznih progresivnih kroničnih nefropatija, uključujući IgA nefropatiju, autosomno dominantnu adultnu policističnu bubrežnu bolest i dijabetičku nefropatiju (188). Kronična i

dugotrajna oštećenja bubrežnog parenhima dovode do endotelne disfunkcije i posljedične bubrežne hipoksije koja inducira pro-fibrotičke promjene tubularnih epitelnih stanica aktivacijom Snaila putem više signalnih putova, poput hipoksija inducibilnog čimbenika 1 α (*engl. hypoxia-inducible factor 1 α , HIF 1 α*), TGF β , Notch, Wnt i drugih (189).

1.10.3. Wnt4

Wnt4 kao sekrecijski signalni glikoprotein je sastavni dio velike obitelji proteina koji svoje različite stanične funkcije izvršava putem najmanje tri specifična unutarstanična signalna puta, uključujući kanonični ili Wnt/ β -katenin ovisni put i nekanonični ili Wnt/ β -katenin neovisni signalni put. Wnt signalni putovi sudjeluju u kontroli niza staničnih funkcija poput kontrole staničnog preživljavanja, stanične polarnosti, proliferacije i motiliteta kao i obnovi matičnih stanica (190). Također, Wnt signalni putovi imaju važnu ulogu u organogenezi za vrijeme embriogeneze te mutagenezi i karcinogenezi (191). Posljedično tome, poremećaji sastavnica Wnt signalnog puta se dovode u vezu s različitim skeletnim defektima, defektima neurološke cijevi poput spine bifide, ali i razvojem karcinoma dojke, pluća, prostate, kože i debelog crijeva (192, 193). Štoviše, poticanjem nastanka reaktivnih kisikovih radikala koji uzrokuju ekstenzivna mitohondrijska oštećenja, Wnt signalni put ima ulogu i u razvoju „ozljedom-inducirane“ inzulinske rezistencije u šećernoj bolesti tipa 2 (194). Na razini bubrega, Wnt/ β -katenin signalni put djeluje kao snažan posrednik tubularnog EMT procesa induciranjem njegovih ciljnih gena, kao što su matriksna metaloproteinaza 7, fibronektin i Snail. Time ovaj signalni put inducira ozljedu podocita i mezangijalnih stanica u uvjetima s visokom koncentracijom glukoze te ima ključnu ulogu u pojavljivanju i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega (195).

1.10.4. Notch2

Notch signalni put predstavlja visoko konzerviran signalni put koji sudjeluje u velikom broju staničnih diferencijacijskih procesa tijekom embriogeneze, ali i u adultnom organizmu (196, 197). Poznata je uloga Notch signalnog puta u razvoju neuralne cijevi, gušterače, pluća i srčanog mišića kao i u angiogenezi, ekspanziji hematopoetskih matičnih stanica, razvoju T-stanica iz zajedničkog limfoidnog prekursora i brojnim drugima (198). Sukladno tome, poremećaji Notch liganada ili receptora se dovode u vezu s razvojem različitih bolesti, poput T-stanične akutne limfoblastične leukemije, autosomno dominantne cerebralne arteriopatije sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom, multiple skleroze, tetralogije Fallot i drugih

(199, 200). Notch signalni put ima važnu ulogu i u bubrežnoj embriogenezi te su njegove mutacije prethodno bile povezane s različitim abnormalnostima u razvoju bubrega (201). Aktivira se vezivanjem jednog od njegovih pet specifičnih liganda (delta-sličan ligand 1, 3 i 4 i nazubljeni ligand 1 i 2) na transmembranski receptorski protein Notch (Notch 1-4). S obzirom na nemali broj sastavnica Notch signalnog puta, točna uloga svakog od Notch receptora i liganada u različitim patološkim stanjima još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Naime, poznato je da pojačana ekspresija određenih komponenti Notch signalnog puta poput Notch1 u odraslom bubregu inducira apoptozu podocita i tubularnih epitelnih stanica, proliferaciju mezangija i glomerularnu sklerozu, čime se potiče proces epitelno-mezenhimalne tranzicije i ubrzava bubrežna tubulointersticijska fibroza u različitim oblicima kronične bubrežne bolesti, uključujući dijabetičku bolest bubrega (202). S druge strane, pojačana ekspresija Notch2 u dijabetičkim bubrezima nije pokazala slične učinke u nekoliko neovisnih istraživanja (203). Primjena inhibitora Notch signalnog puta poput glividona, berberina i drugih dovela je do značajnog smanjenja razine komponenti Notch signalnog puta i Snaila kao glavnog transkripcijskog čimbenika u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije uz prateće smanjenje progresije tubulointersticijske fibroze i poboljšanje bubrežne funkcije (204).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi

Štakorski model šećerne bolesti tipa 1 induciran streptozotocinom (STZ) se u dosadašnjim istraživanjima pokazao kao prikladan model za proučavanje promjena izazvanih hiperglikemijom i njenim posljedicama. Iako postoji nekolicina istraživanja koja na štakorskom modelu šećerne bolesti proučavaju promjene u bubrežnom izražaju čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije u kontekstu šećerne bolesti, dokazi o izražaju gena za popravak pogrešno sparene DNA u dijabetičkoj bolesti bubrega su u dostupnoj literaturi nedostadni, posebice uvažavajući njihovu ključnu ulogu u procesu karcinogeneze te od ranije poznatu vezu između šećerne bolesti i razvoja karcinoma bubrega. Sukladno svemu navedenom, a s obzirom da postojeći terapijski tretmani još uvijek ne mogu na zadovoljavajući način kontrolirati napredovanje dijabetičke bolesti bubrega do završnih stadija kronične bubrežne bolesti, cilj našeg istraživanja i predložene disertacije je ispitati imunohistokemijski obrazac izražaja gena za popravak pogrešno sparene DNA kao i čimbenika povezanih s EMT-om u kratkotrajnom dijabetičkom modelu bubrega štakora, kako bismo istražili njihovu potencijalnu ulogu u razvoju i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega te pokretanju bubrežne karcinogeneze kod dijabetičara, ali i dali osnovu za daljnja istraživanja s ciljem osmišljavanja novih modaliteta liječenja dijabetičke bubrežne bolesti.

Sukladno tome, predložena disertacija se bavi istraživanjem promjena u izražaju gena za popravak pogrešno sparene DNA i čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije u bubrezima streptozotocinom induciranih štakora sa šećernom bolesti tipa 1, u vremenskim intervalima od dva tjedna i dva mjeseca od indukcije šećerne bolesti.

Cilj predloženog istraživanja je primjenom imunofluorescencijskih biljega na gene za popravak pogrešno sparene DNA (MLH1, MSH2, PMS2 i γH2AFX) i čimbenike epitelno-mezenhimalne tranzicije (Snail, Wnt4 i Notch2) usporediti izražaj navedenih čimbenika na razini čitavog bubrega kao i u pojedinačnim strukturama bubrežne kore (glomeruli, proksimalni zavijeni kanalići, distalni zavijeni kanalići) zdravih štakora i štakora sa šećernom bolesti tipa 1 u vremenskim intervalima od 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti, kako bi shvatili značaj izražaja navedenih gena u bubrezima jedinki oboljelih od šećerne bolesti.

Sporedni ciljevi istraživanja:

a) Analizirati jačinu izražaja MLH1, MSH2, PMS2 i γH2AFX gena te Snail, Wnt4 i Notch2 u različitim strukturama bubrega zdravih štakora (glomeruli, proksimalni i distalni zavijeni

kanalići) te bubrega štakora oboljelih od šećerne bolesti uz imunofluorescencijsko bojanje MLH1, MSH2, PMS2, γH2AFX, Snail, Wnt4 i Notch2 te DAPI bojenjem jezgre.

b) Primjenom dvostrukog imunofluorescencijskog bojanja istražiti prostornu i vremensku raspodjelu pojavljivanja biljega MLH1, MSH2, PMS2, γH2AFX, Snail, Wnt4 i Notch2 između bubrega zdravih i dijabetičkih štakora u odgovarajućim vremenskim razdobljima (dva tjedna i dva mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti) korištenjem imunofluorescencije

c) Primjenom dvostrukog imunofluorescencijskog bojanja usporediti raspodjelu pojavljivanja istraživanih biljega, i to:

- MLH1, MSH2, PMS2 i γH2AFX u zdravom tkivu bubrega u različitim vremenskim razdobljima (2 tjedna i 2 mjeseca od indukcije šećerne bolesti) te u tkivu bubrega jedinki oboljelih od šećerne bolesti

- MLH1, MSH2, PMS2 i γH2AFX između tkiva zdravog bubrega i tkiva bubrega jedinki oboljelih od šećerne bolesti unutar istog vremenskog razdoblja

- MLH1, MSH2, PMS2 i γH2AFX u različitim strukturama bubrežne kore (glomeruli, proksimalni i distalni zavijeni kanalići) između tkiva zdravog bubrega i bubrega jedinki oboljelih od šećerne bolesti u različitim vremenskim razdobljima (2 tjedna i 2 mjeseca od indukcije šećerne bolesti)

- Snail, Wnt4 i Notch2 u zdravom tkivu bubrega u različitim vremenskim razdobljima (2 tjedna i 2 mjeseca od indukcije šećerne bolesti) te u tkivu bubrega jedinki oboljelih od šećerne bolesti

- Snail, Wnt4 i Notch2 između tkiva zdravog bubrega i tkiva bubrega jedinki oboljelih od šećerne bolesti unutar istog vremenskog razdoblja

- Snail, Wnt4 i Notch2 u različitim strukturama bubrežne kore (glomeruli, proksimalni i distalni zavijeni kanalići) između zdravog bubrega i bubrega jedinki oboljelih od šećerne bolesti u različitim vremenskim razdobljima (2 tjedna i 2 mjeseca od indukcije šećerne bolesti)

2.2. Hipoteza

Izražaj gena za popravak pogrešno sparene DNA (MLH1, MSH2, PMS2 i γH2AFX) u bubrežima štakora oboljelih od šećerne bolesti u vremenskim intervalima od dva tjedna i dva mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u razvoju i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega, kao i na potencijalnu vezu između dijabetičke nefropatije i bubrežne karcinogeneze, dok pojačan izražaj Snail, Wnt4 i Notch2 u bubrežima jedinki oboljelih od šećerne bolesti ukazuje na važnost procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije u progresiji dijabetičke bolesti bubrega do završnih stadija kronične bubrežne bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etičko odobrenje

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu odobrilo je eksperimentalni protokol ove studije te dalo suglasnost da je istraživanje u skladu s odredbama Etičkog kodeksa koja reguliraju istraživanje na ljudima i životinjama u znanstvenom, istraživačkom i stručnom radu, kao i etičkim načelima Helsinške deklaracije (Br. 16/4-09). Svi pokusi unutar istraživanja provedeni su u skladu sa smjericama za rukovanje laboratorijskim životinjama (European Communities Council Directive 24.11.1986.) Poduzete su sve potrebne mjere kako bi se minimalizirao broj životinja i njihova patnja tijekom eksperimenta.

3.2. Pokusne životinje

Pokusne životinje generirane su od strane pogona za životinje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Mužjaci štakora Sprague Dawley, težine između 160 i 180 g, uzgajani su na kontroliranoj temperaturi od 22 ± 1 ° C i svjetlosnom programu od 12 sati mraka i 12 sati svjetlosti (12h noć/dan ciklusi).

3.3. Indukcija i utvrđivanje šećerne bolesti

Indukcija šećerne bolesti tipa 1 (DM1) pokusnim životinjama izvedena je intraperitonealnom injekcijom 55 mg/kg tjelesne težine streptozotocina (STZ) otopljenog u citratnom puferu (pH 4,5). S druge strane, kontrolnim životinjama ubrizgan je nosač to jest citratni pufer. Štakori su hranjeni „ad libitum“, standardnom laboratorijskom prehranom (4RF21 GLP, Mucedola, Settimo Milanese, Italija). Indukcija šećerne bolesti potvrđena je mjerenjem razine glukoze u plazmi u krvi iz repne vene (pomoću instrumenta OneTouch Vita, LifeScan, High Wycombe, UK). Kriterij za uključivanje bila je razina glukoze u krvnoj plazmi viša od 16,5 mmol/L. Svi štakori u eksperimentalnoj skupini su razvili simptome šećerne bolesti (poliurija, polidipsija i drugi). Težina pokusnih životinja na početku eksperimenta bila je 160 ± 2 g, nakon dva tjedna 208 ± 9 g i na kraju (nakon dva mjeseca) 244 ± 7 g. Koncentracije glukoze su iznosile 27 ± 3 mmol/L (dva tjedna) i 27 ± 2 mmol/L (dva mjeseca). Težina kontrolnih životinja na početku istraživanja bila je 167 ± 15 g, nakon dva tjedna 250 ± 6 g i na kraju (nakon dva mjeseca) 466 ± 13 g. Koncentracije glukoze u kontrolnoj skupini iznosile su $7,5 \pm 0,5$ mmol/L i $7,2 \pm 0,4$ mmol/L nakon 2 tjedna i 2 mjeseca. Ovisno o vremenu provedenom od injekcije streptozotocina, štakori su bili podijeljeni u sljedeće skupine: dijabetičari s 2 tjedna (DM 2w) i 2 mjeseca (DM

2m) uz odgovarajuće kontrolne skupine (C 2w i C 2m). U svakoj ispitivanoj grupi bilo je 6 životinja.

3.4. Prikupljanje i priprema tkiva

Životinje su anestezirane izofluranom (Forane, Abbott Laboratories, Queenborough, UK) i perfundirane fiziološkom otopinom i Zambonijevim fiksatorom [4% paraformaldehida i 1,5% pikarske kiseline u 0,1 M fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (PBS) u dozi od 300 ml pri pH 7,4]. Poprečni rezovi kroz bubrežnu srž uklopljeni su u parafin za daljnje analize. Tkivo parafinskih blokova izrezano je na dijelove debljine 5 μ m. Nakon deparafinizacije, dijelovi su rehidrirani (voda i etanol), isprani (destilirana voda) i zagrijani u puferu natrijevog citrata na 95°C i pH 6,0 tijekom 12 minuta.

3.5. Imunohistokemijsko bojenje i mikroskopska obrada

Nakon pripreme, presjeci su preko noći inkubirani s primarnim antitijelima u navlaženoj komori kako je prikazano u tablici 1 i 2. Nakon ispiranja u PBS-u, primijenjena su tijekom jednog sata sekundarna antitijela kako je prikazano u tablici 1 i 2. Presjeci su isprani i obojeni 4,6-diamidin-20-fenilindol dihidrokloridom (DAPI) za nuklearno bojanje.

Tablica 1. Korištena primarna i sekundarna antitijela za imunohistokemijsko bojenje gena za popravak pogrešno sparene DNA

Primarna antitijela	Razrijeđenje	Sekundarna antitijela	Razrijeđenje
Rabbit Anti-PMS2 antibody [EPR3947] (ab110638, Abcam, Cambridge, UK)	1: 200	Rhodamine (TRITC) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (Cat. No. 711-025-152, Jackson IR, Cambridge, UK)	1:400
Purified Mouse Anti-Human MSH-2 (Cat. No 556349, BD Pharmingen, San Jose, USA)	1:300	Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Cat. No. 715-545-150, Jackson IR, Cambridge, UK)	1:400
Purified Mouse Anti-Human MLH-1 (Cat. No 550838, BD	1:100	Rhodamine Red™-X AffiniPure Donkey Anti-	1:400

Pharmingen, San Jose, USA)		Mouse IgG (Cat. No. 715-295-151, Jackson IR, Cambridge, UK)	
Purified Mouse anti-H2AX (Cat. No 560443, BD Pharmingen, San Jose, USA)	1:500	Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Cat. No. 715-545-150, Jackson IR, Cambridge, UK)	1:400

Tablica 2. Korištena primarna i sekundarna antitijela za imunohistokemijsko bojenje čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije

Primarna antitijela	Razrijeđenje	Sekundarna antitijela	Razrijeđenje
Purified Goat Anti-Snail antibody (ab 53519)	1: 500	Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (Cat. No. 713-545-003, Jackson IR, Cambridge, UK)	1:300
Purified Rabbit Anti-Notch2 antibody (ab 8926)	1:100	Rhodamine (TRITC) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (Cat. No. 711-025-152, Jackson IR, Cambridge, UK)	1:400
Purified Rabbit Anti-Wnt4 antibody (ab 91226)	1:25	Rhodamine Red™-X AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Cat. No. 715-295-151, Jackson IR, Cambridge, UK)	1:400

3.6. Analiza slika i kvantifikacija

Presjeci bubrega fotografirani su pomoću BX51 mikroskopa (Olympus, Tokio, Japan). Zatim su prikupljene fotografije pregledane pomoću softvera Cella Imaging Software for Life Sciences Microscopy (Olympus). Tri bubrežne strukture: glomeruli, proksimalni zavijeni kanalići (PCT) i distalni zavijeni kanalići (DCT) analizirani su u odjeljcima bubrega. Za daljnju analizu zabilježeno je 20 polja na povećanju x40. Slike su analizirane pomoću softvera ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) brojanjem broja pozitivnih jezgri. Pozitivne jezgre određene su bojom (zelena za MSH2 i γ H2AFx, crvena za MLH1 i PMS2; zelena za Snail, crvena za Wnt4 i Notch2) u jezgrama ili perinuklearnom području u uzorcima bubrega. Izvršena je usporedba kontrolne i dijabetičke skupine štakora u postotku pozitivnih jezgri u tri analizirane bubrežne strukture (glomeruli, proksimalni i distalni zavijeni kanalići) kao i na razini čitavog bubrega.

3.7. Statistička analiza

3.7.1 Izračun veličine uzorka

Za potrebe ovog istraživanja proveden je izračun veličine uzorka u programu G*Power 3.1.2 (Franz Faul, Universitaet Kiel, Njemačka). Kao temelj za izračun odabrana je površina bubrežnog parenhima prekrivena pozitivnim stanicama na ispitivane biljege u odnosu na ukupnu površinu mikrofotografije u područjima od interesa. Medijan pokusne skupine je bio 0.014, a u kontrolnoj skupini je iznosio 0.031 s mjerom varijabilnosti 0.8. S obzirom na rezultate provedene pilot studije procjena veličine uzorka utvrdila je minimalan broj od 6 životinja po skupini da bi studija imala odgovarajuću snagu istraživanja od 80% ($1-\beta$) uz razinu značajnosti od $\alpha = 5\%$. U istraživanje su uvrštene životinje koje su zadovoljile kriterije uključenja ovisno o vrijednostima glukoze u krvnoj plazmi, a njihov konačan broj u skupinama je zadovoljio potrebnu veličinu uzorka.

3.7.2 Statistički postupci

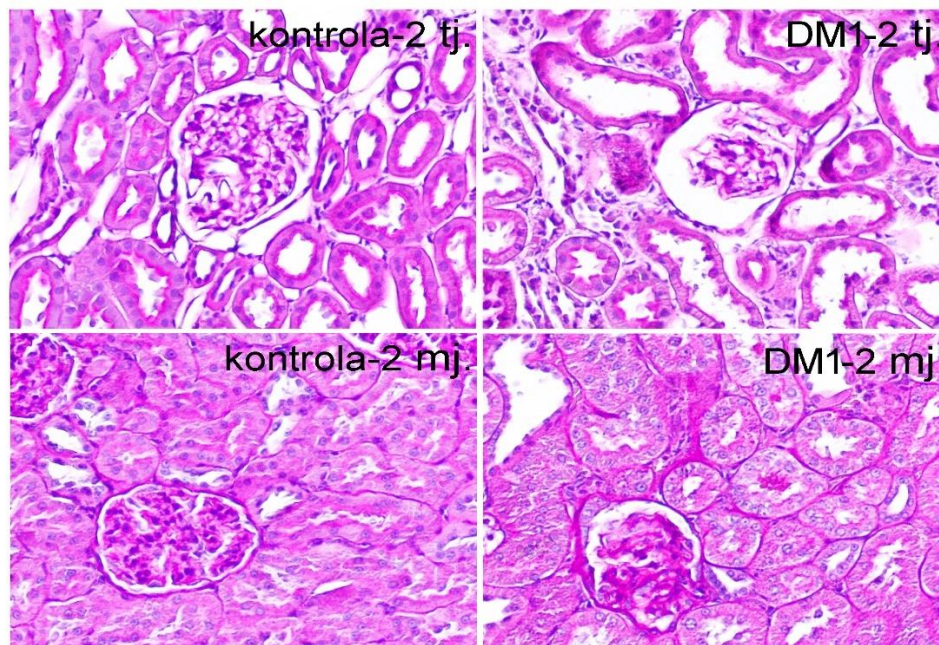
Za statističku analizu korišten je Kruskal-Wallisov test praćen Mann-Whitneyjevim testom te two-way ANOVA test praćen Tukey multiplim komparacijskim testom i nesparenim t-testom za definiranje statističkih razlika između skupina nakon prethodnog testiranja distribucije

podataka. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD sa statističkom značajnošću postavljenom na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Prikaz hematoksilin-eozin bojenja preparata bubrežnog tkiva kontrolnih i dijabetičkih štakora

Najprije smo preparate bubrežnog tkiva kontrolnih (zdravih) štakora i štakora sa šećernom bolesti tipa 1 u odgovarajućim vremenskim intervalima od 2 tjedna i 2 mjeseca od indukcije šećerne bolesti obojili hematoksilin-eozin bojilom. Navedenim smo uočili karakteristične promjene bubrežnog tkiva koje se događaju u bubrezima jedinki oboljelih od šećerne bolesti. Pri tome se u početnom razdoblju od 2 tjedna od inicijacije šećerne bolesti može uočiti značajno proširen Bowmanov prostor, dok se u razdoblju od 2 mjeseca može vidjeti zadebljanje Bowmanove čahure, izražena ekspanzija mezangija uz lezije koje mogu odgovarati Kimmelstiel-Wilsonovim čvorićima te početni znakovi tubulointersticijske fibroze (slika 1).

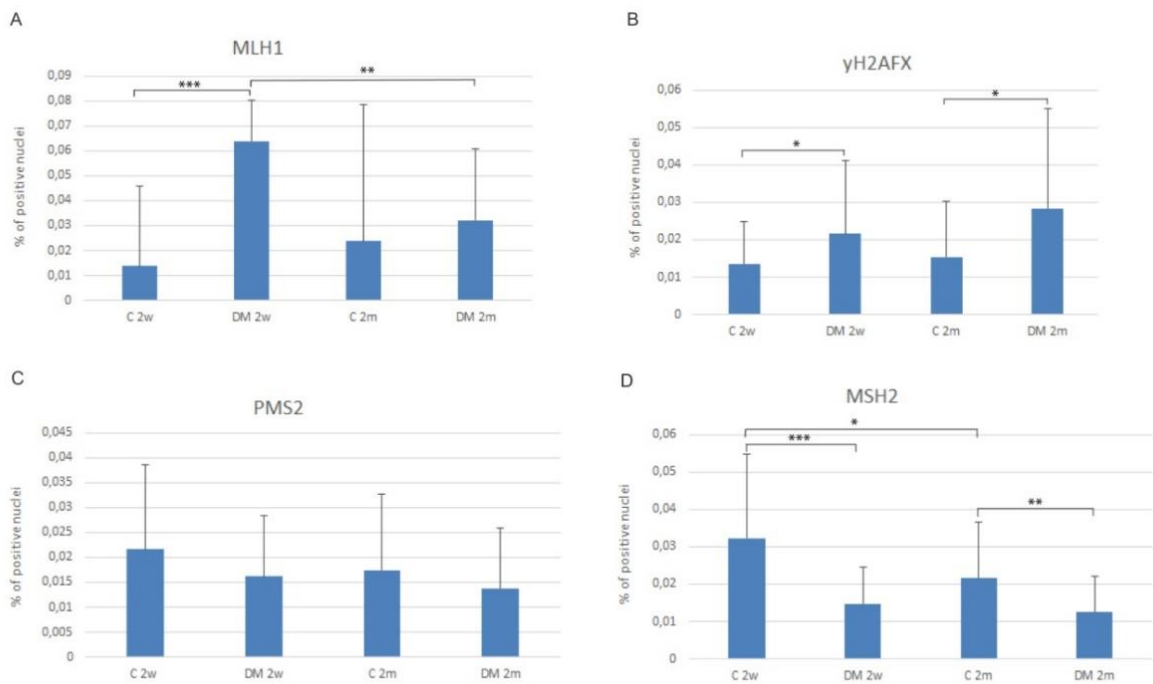


Slika 1. Prikaz H&E obojanog preparata bubrežnog tkiva zdravih štakora (kontrola) i štakora sa šećernom bolesti tipa 1 (DM1) u vremenskim intervalima od 2 tjedna (2 tj.) i 2 mjeseca (2 mj.) od indukcije šećerne bolesti

4.2. Ukupan broj MLH1, yH2AFX, PMS2 i MSH2 pozitivnih stanica u bubrezima dijabetičke i kontrolne skupine štakora

Na samom početku ispitan je i analiziran ukupan broj MLH1, yH2AFX, PMS2 i MSH2 pozitivnih stanica na razini čitavog bubrega između eksperimentalne i kontrolne skupine štakora, uključujući sve strukture bubrežne kore (G, PCT i DCT). Indukcija šećerne bolesti rezultirala je većim izražajem MLH1 već 2 tjedna nakon početka šećerne bolesti sa 6,39 % pozitivnih jezgri u

usporedbi s 1,38 % pozitivnih jezgri u kontrolnoj skupini ($p < 0,0001$). S druge strane, nije bilo značajne razlike u izražaju MLH1 u bubrežima između skupina nakon 2 mjeseca ($p = 0,1336$) (slika 2). Ukupan broj γ H2AFX pozitivnih stanica bio je veći u skupini štakora sa šećernom bolesti, u usporedbi s kontrolnim skupinama, i nakon 2 tjedna i 2 mjeseca (2,15 % prema 1,34 % i 2,83 % prema 1,53 % pozitivnih jezgri u navedenim skupinama) ($p = 0,0317$; $p = 0,0135$).

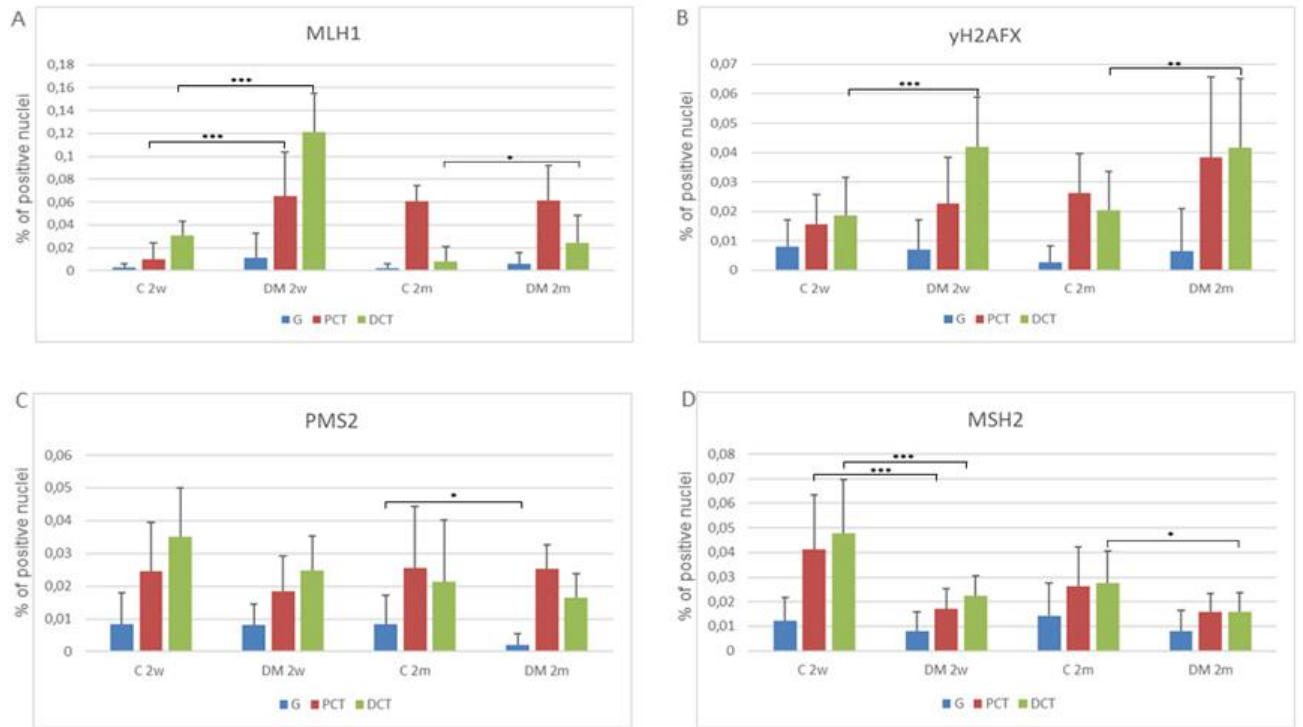


Slika 2. Postotak MLH1 (A), γ H2AFX (B), PMS2 (C) i MSH2 (D) pozitivnih stanica u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u vremenskim razdobljima od 2 tjedna (2w) i 2 mjeseca (2m). Podaci prikazani kao prosjek \pm SD, Man-Whitney test. Zvezdice označavaju značajnu razliku: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

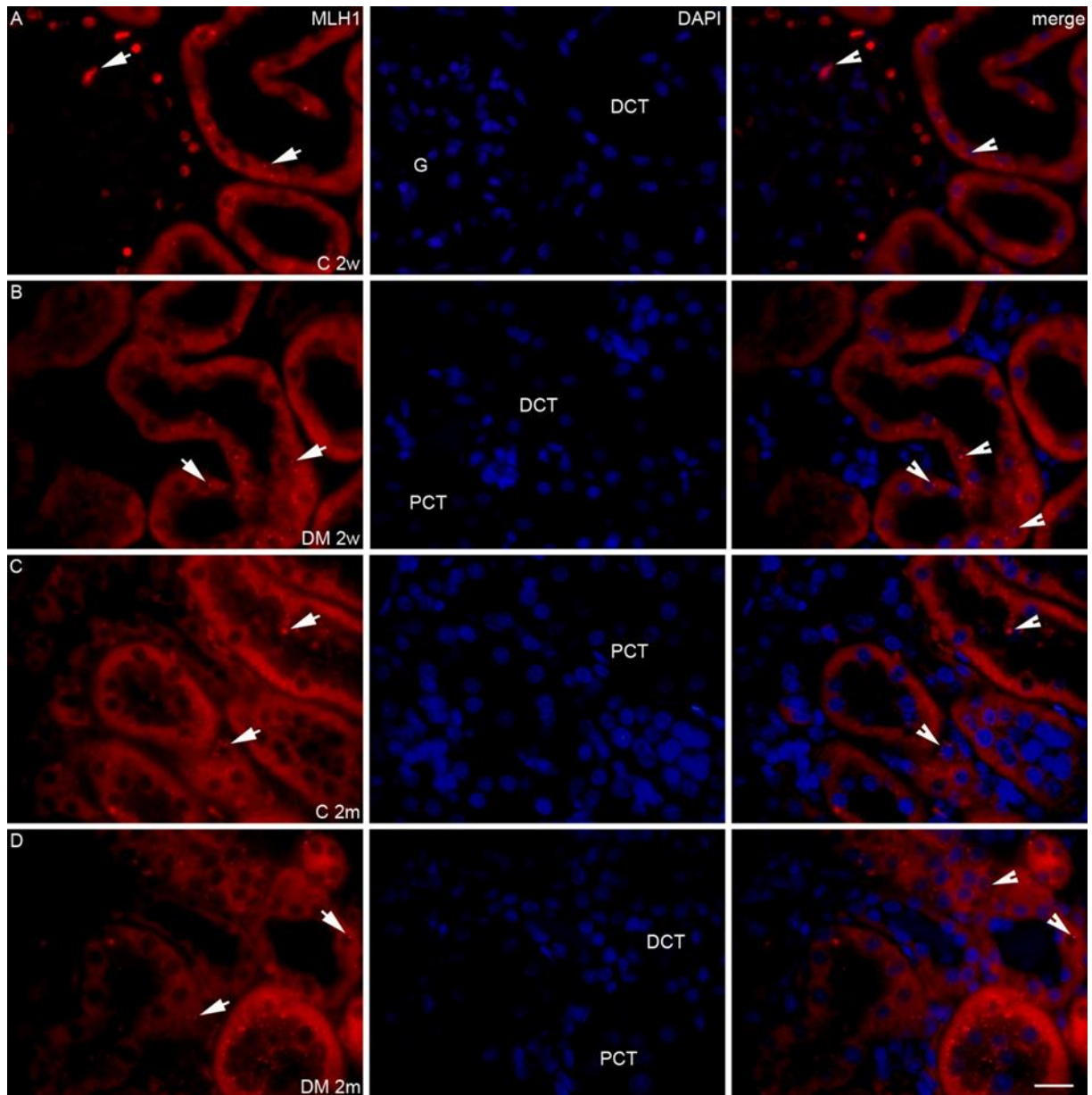
Izražaj PMS2 u bubrežima je bio usporediv između kontrolne i dijabetičke skupine štakora kroz cijelo analizirano razdoblje, bez zabilježene statistički značajne razlike u broju PMS2 pozitivnih stanica između skupina (slika 2). Veći udio MSH2 pozitivnih stanica primijećen je u bubrežima kontrolnih životinja u usporedbi s eksperimentalnom skupinom u obje vremenske točke ($p < 0,0001$; $p = 0,0019$), sa značajno većom razlikom zabilježenom u početnom razdoblju od 2 tjedna nakon početka šećerne bolesti (3,22 % u odnosu na 1,48 %) (slika 2).

4.3. MLH1, yH2AFX, PMS2 i MSH2 pozitivne stanice u različitim strukturama bubrežne kore dijabetičkih i kontrolnih bubrega

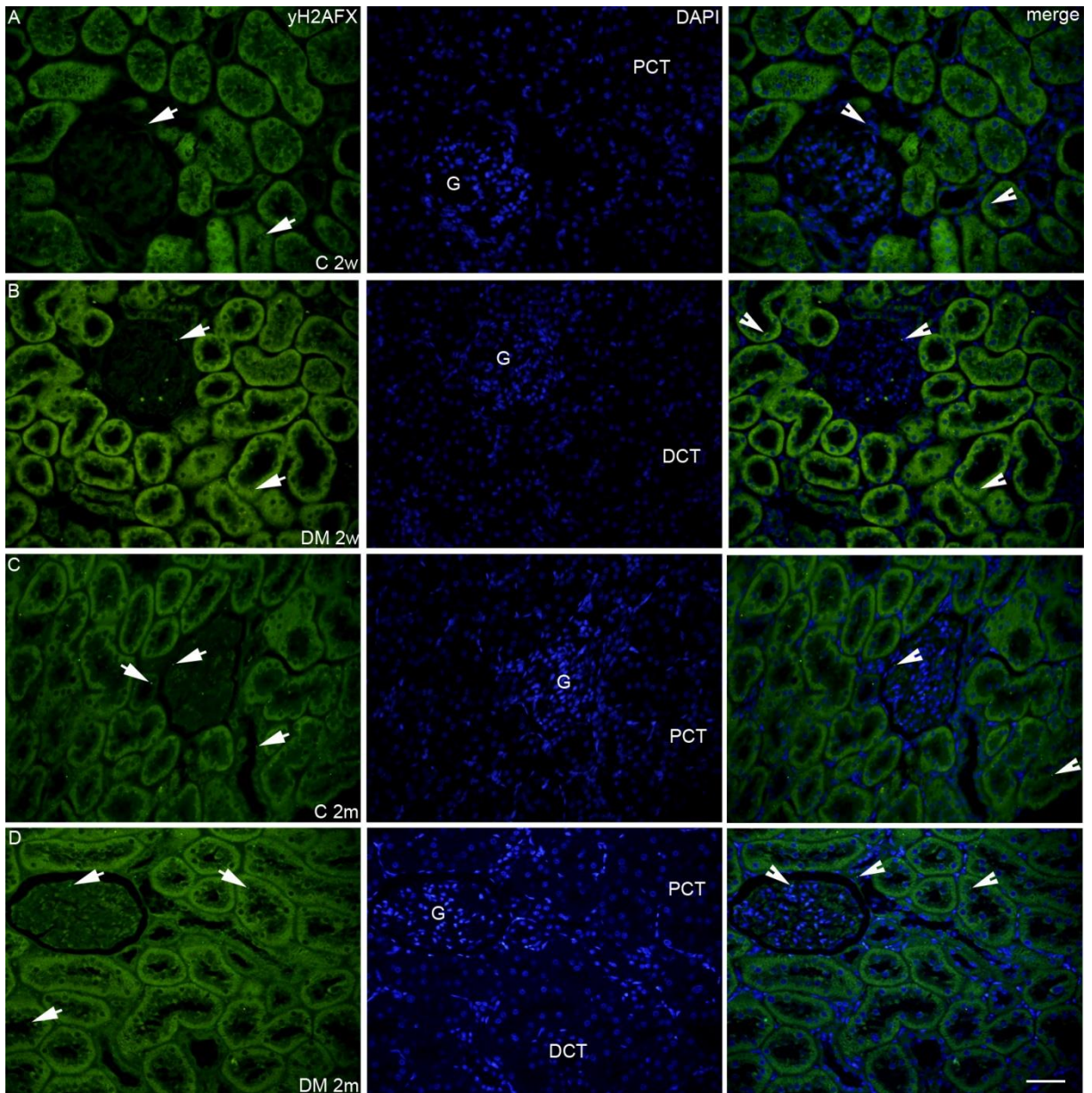
MLH1 je bio više izražen u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima dijabetičkih životinja sa 6,52 % i 12,12 % pozitivnih jezgri, u usporedbi s 0,97 % i 3,1 % pozitivnih jezgri u kontrolnim skupinama u početnom razdoblju od 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti ($p < 0,001$) (slika 3). Dva mjeseca nakon prezentacije šećerne bolesti, veći udio MLH1 pozitivnih stanica primijećen je samo u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičke skupine ($p < 0,05$) (slika 4). Što se izražaja yH2AFX tiče, značajna razlika uočena je samo u distalnim zavijenim kanalićima 2 tjedna nakon indukcije ($p < 0,001$), u korist dijabetičke skupine koja je imala više yH2AFX pozitivnih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu (4,18% prema 1,86 %) (slika 3). Osim toga, nakon dva mjeseca, distalni zavijeni kanalići dijabetičke skupine su ponovno pokazali značajno veći izražaj yH2AFX ($p < 0,01$), dok nije bilo značajne razlike u izražaju yH2AFX u drugim komponentama bubrežne kore (G, PCT) tijekom cijelog ispitivanog vremenskog razdoblja (slika 5). PMS2 je u glomerulima obje skupine pokazao nisku stopu izražaja u usporedbi s proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima (slika 6). Iako nije bilo značajne razlike u postotku PMS2 pozitivnih stanica u glomerulima između kontrolnih i dijabetičkih štakora nakon 2 tjedna, izražaj PMS2 u glomerulima se smanjio tijekom vremena u skupini sa šećernom bolesti, za razliku od kontrolne skupine ($p < 0,05$). Proksimalni i distalni zavijeni kanalići pokazali su sličan obrazac izražaja PMS2 između skupina tijekom vremena. Također, zabilježen je veći izražaj MSH2 u proksimalnim zavijenim kanalićima kontrolne skupine nakon 2 tjedna, u usporedbi sa skupinom dijabetičara (4,12 % prema 1,72 %) ($p < 0,001$) (slika 3). Slični rezultati primijećeni su i u distalnim zavijenim kanalićima 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti ($p < 0,001$), također u korist kontrolne skupine. S druge strane, nije bilo značajne razlike u broju MSH2 pozitivnih stanica u glomerulima između skupina 2 tjedna od prezentacije šećerne bolesti, dok je u razdoblju od 2 mjeseca nakon indukcije relevantna razlika bila vidljiva samo u distalnim zavijenim kanalićima ($p < 0,05$), s više MSH2 pozitivnih stanica u kontrolnoj skupini (slika 6).



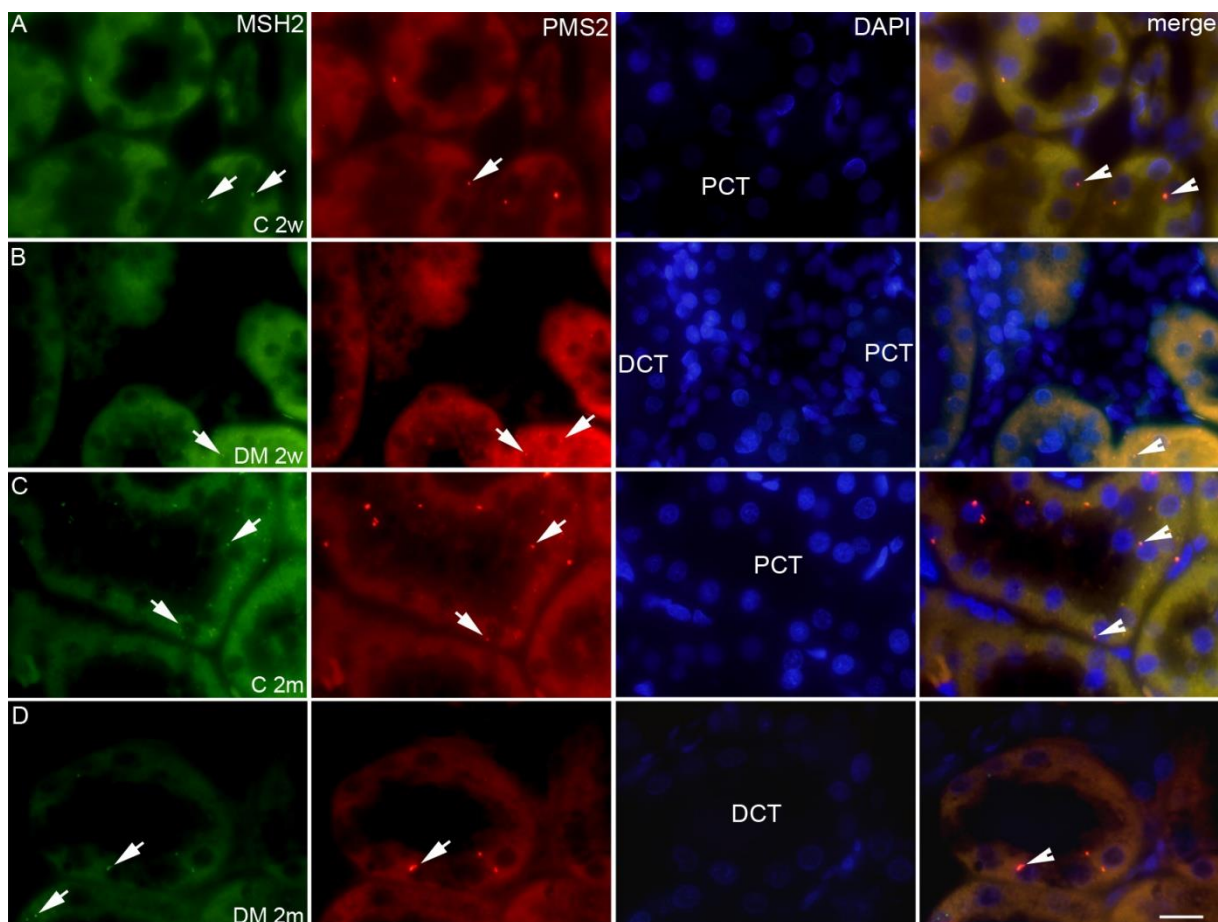
Slika 3. Postotak MLH1 (A), yH2AFX (B), PMS2 (C) i MSH2 (D) pozitivnih stanica u različitim strukturama bubrežne kore – glomeruli (G), proksimalni zavijeni kanalići (PCT) i distalni zavijeni kanalići (DCT) u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u vremenskim razdobljima od 2 tjedna (2w) i 2 mjeseca (2m). Podaci prikazani kao prosjek \pm SD, Man-Whitney test. Zvijezdice označavaju značajnu razliku: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Slika 4. Imunohistokemijski izražaj MLH1 u bubrezima kontrolnih i eksperimentalnih životinja. MLH1 pozitivne stanice u različitim područjima bubrežne kore vidljive kao crveno nuklearno i perinuklearno bojanje (strelice). Bubrežna kora kontrolne skupine u razdoblju od 2 tjedna (A) i 2 mjeseca (C), dijabetičke skupine u razdoblju od 2 tjedna (B) i 2 mjeseca (D). Skala 10 μ m. DCT, distalni zavijeni kanalić; G, glomerul; PCT, proksimalni zavijeni kanalić; C, kontrolna skupina; DM, dijabetička skupina.



Slika 5. Imunohistokemijski izražaj γ H2AFX u bubrezima kontrolnih i eksperimentalnih životinja. γ H2AFX pozitivne stanice u različitim područjima bubrežne kore vidljive kao zeleno nuklearno i perinuklearno bojanje (strelice). Bubrežna kora kontrolne skupine u razdoblju od 2 tjedna (A) i 2 mjeseca (C), dijabetičke skupine u razdoblju od 2 tjedna (B) i 2 mjeseca (D). Skala 25 μ m. DCT, distalni zavijeni kanalić; G, glomerul; PCT, proksimalni zavijeni kanalić; C, kontrolna skupina; DM, dijabetička skupina.

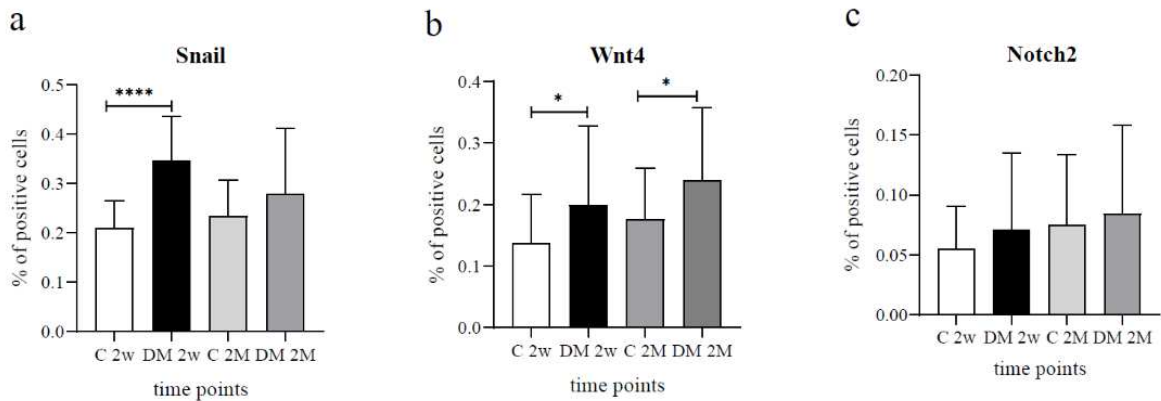


Slika 6. Imunohistokemijski izražaj MSH2 i PMS2 u bubrezima kontrolnih i eksperimentalnih životinja. MSH2 pozitivne stanice u različitim područjima bubrežne kore vidljive kao zeleno nuklearno i perinuklearno bojanje, a PMS2 pozitivne stanice kao crveno nuklearno i perinuklearno bojanje (strelice). Ko-lokalizacija MSH2 i PMS2 prikazana u krajnjoj desnoj koloni (kombinacija boja, tzv. merge). Bubrežna kora kontrolne skupine u razdoblju od 2 tjedna (A) i 2 mjeseca (C), dijabetičke skupine u razdoblju od 2 tjedna (B) i 2 mjeseca (D). Skala 10 μ m. DCT, distalni zavijeni kanalić; G, glomerul; PCT, proksimalni zavijeni kanalić; C, kontrolna skupina; DM, dijabetička skupina.

4.4. Ukupan broj Snail, Wnt4 i Notch2 pozitivnih stanica u bubrezima dijabetičke i kontrolne skupine štakora

U našem istraživanju, Snail je bio pretežno lokaliziran u citoplazmi i perinuklearnom području glomerularnih i tubularnih epitelnih stanica u obje ispitivane skupine (slika 9). Indukcija šećerne bolesti rezultirala je većim izražajem Snaila u razdoblju od dva tjedna nakon indukcije, s 34,67 % pozitivnih stanica u usporedbi s 20,92 % pozitivnih stanica u kontrolnoj skupini ($p <$

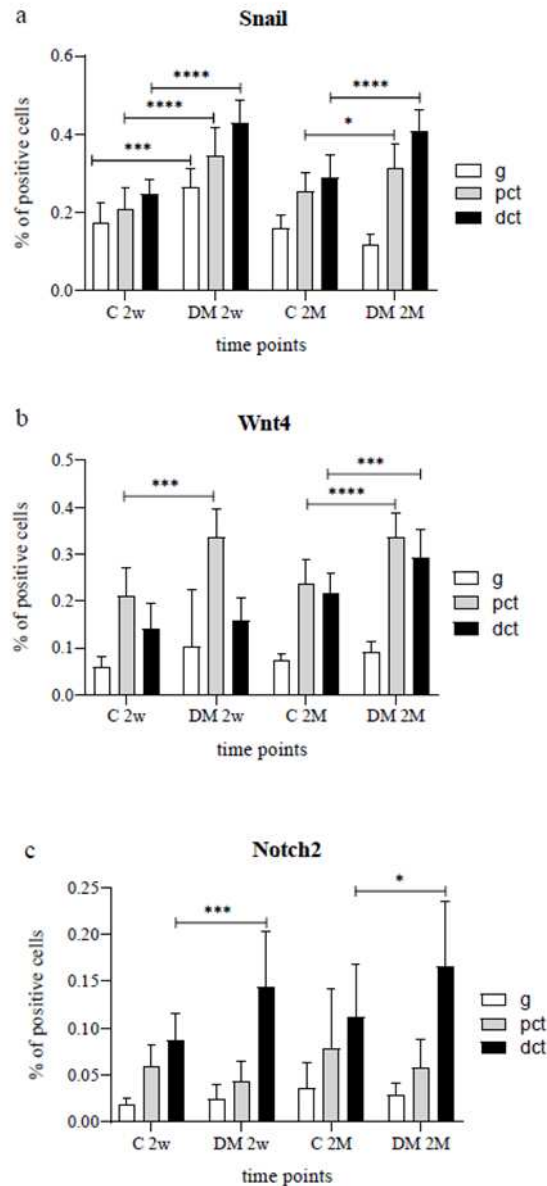
0,0001). S druge strane, nije bilo značajne razlike u izražaju Snaila na razini čitavog bubrega između skupina nakon dva mjeseca (slika 7). Ukupan broj Wnt4 pozitivnih stanica bio je veći u skupini dijabetičara u usporedbi s kontrolnom skupinom, i dva tjedna i dva mjeseca nakon prezentacije šećerne bolesti (19,90 % naspram 13,72 % i 23,97 % naspram 17,58 % pozitivnih stanica u eksperimentalnim skupinama) ($p < 0,05$). S druge strane, izražaj Notch2 u bubrezima između dijabetičkih i kontrolnih skupina štakora je bio usporediv i bez zabilježenih značajnih razlika tijekom cijelog razdoblja istraživanja (slika 7).



Slika 7. Postotak Snail (a), Wnt4 (b) i Notch 2 (c) pozitivnih stanica u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u vremenskim razdobljima od 2 tjedna (2w) i 2 mjeseca (2M). Podaci prikazani kao prosjek \pm SD, Man-Whitney test. Zvezdice označavaju značajnu razliku: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.5. Snail, Wnt4 i Notch2 pozitivne stanice u različitim strukturama bubrežne kore dijabetičkih i kontrolnih bubrega

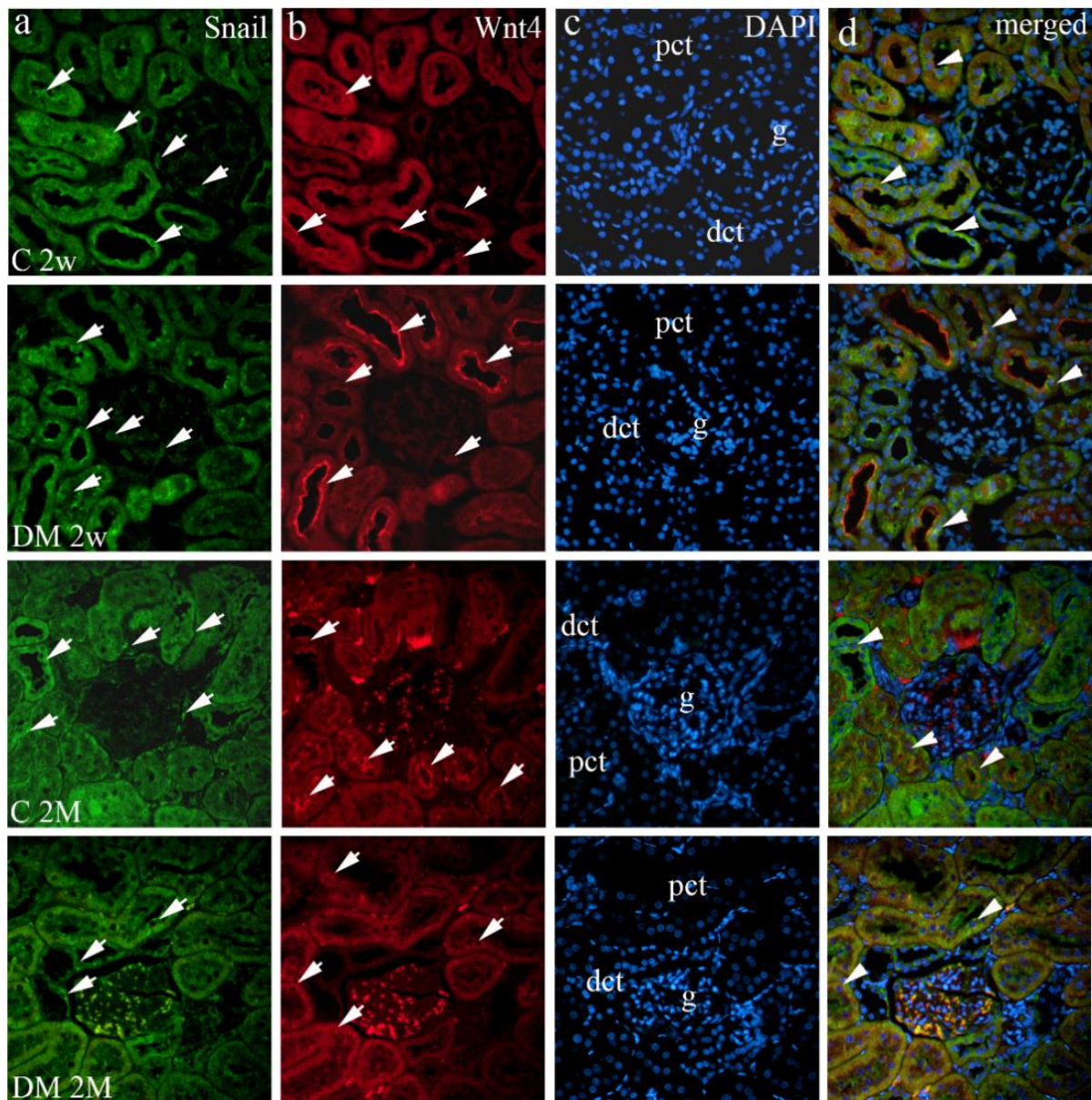
Wnt4 je bio snažno izražen uglavnom na membranama proksimalnih zavijenih kanalića i umjereno u distalnim zavijenim kanalićima kontrolne i dijabetičke skupine. Nasuprot tome, glomerularni izražaj Wnt4 ostao je na vrlo niskoj razini i blagog intenziteta u obje skupine tijekom čitavog vremena istraživanja (slika 9).



Slika 8. Postotak *Snail* (a), *Wnt4* (b) i *Notch 2* (c) pozitivnih stanica u različitim strukturama bubrežne kore – glomeruli (g), proksimalni zavijeni kanalići (pct) i distalni zavijeni kanalići (dct) u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u vremenskim razdobljima od 2 tjedna (2w) i 2 mjeseca (2M). Podaci prikazani kao prosjek \pm SD, Man-Whitney test. Zvezdice označavaju značajnu razliku: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dva tjedna nakon indukcije šećerne bolesti značajna razlika uočena je samo u proksimalnim zavijenim kanalićima ($p < 0,001$) u korist dijabetičke skupine koja je imala više *Wnt4* pozitivnih stanica (33,54 % prema 21,25 %). Osim toga, dva mjeseca nakon inicijacije, izražaj *Wnt4* u proksimalnim zavijenim kanalićima bio je opetovano značajno veći u

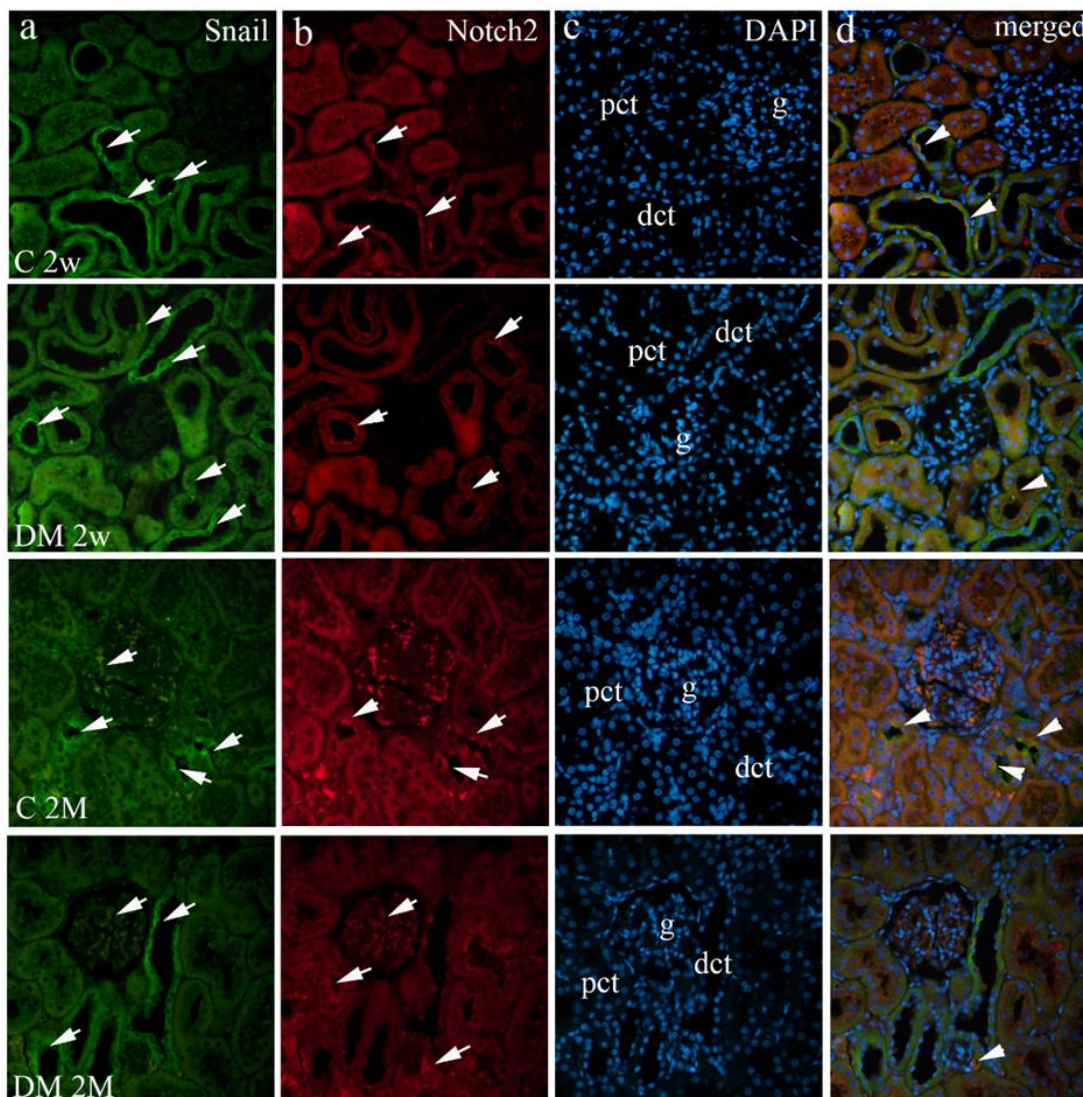
eksperimentalnoj skupini ($p < 0,0001$), u usporedbi s njihovom kontrolnom skupinom. Štoviše, i u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičkih životinja zabilježen je veći udio Wnt4 pozitivnih stanica u istoj vremenskoj točki ($p < 0,001$), dok nije bilo značajne razlike u izražaju Wnt4 u glomerulima između skupina (slika 8). DAPI nuklearno bojenje otkrilo je ko-lokalizaciju Snaila i Wnt4 u tubularnim epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića, dok nije bilo Snail i Wnt4 ko-lokalizacije u glomerularnim stanicama (slika 9d).



Slika 9. Imunohistokemijski izražaj Snail i Wnt4 u bubrezima kontrolnih i eksperimentalnih životinja. Snail pozitivne stanice u različitim područjima bubrežne kore vidljive kao zeleno citoplazmatsko i membransko bojanje, a Wnt4 pozitivne stanice kao crveno citoplazmatsko i membransko bojanje (strelice). Ko-lokalizacija Snail i Wnt4 prikazana u krajnjoj desnoj koloni

(kombinacija boja - merged). Bubrežna kora kontrolne skupine u razdoblju od 2 tjedna i 2 mjeseca i dijabetičke skupine u razdoblju od 2 tjedna i 2 mjeseca. dct, distalni zavijeni kanalić; g, glomerul; pct, proksimalni zavijeni kanalić; C, kontrolna skupina; DM, dijabetička skupina.

Notch2 je bio izražen uglavnom na membranama tubularnih epitelnih stanica proksimalnih zavijenih kanalića i perinuklearnom području tubularnih stanica distalnih zavijenih kanalića (Slika 10).



Slika 10. Imunohistokemijski izražaj Snail i Notch2 u bubrezima kontrolnih i eksperimentalnih životinja. Snail pozitivne stanice u različitim područjima bubrežne kore vidljive kao zeleno citoplazmatsko i membransko bojanje, a Notch2 pozitivne stanice kao crveno citoplazmatsko i membransko bojanje (strelice). Ko-lokalizacija Snail i Notch2 prikazana u krajnjoj desnoj koloni (kombinacija boja - merged). Bubrežna kora kontrolne skupine u razdoblju od 2 tjedna i

2 mjeseca i dijabetičke skupine u razdoblju od 2 tjedna i 2 mjeseca. *dct*, distalni zavijeni kanalić; *g*, glomerul; *pct*, proksimalni zavijeni kanalić; *C*, kontrolna skupina; *DM*, dijabetička skupina.

Općenito, postojao je pretežno nizak obrazac izražaja Notch2 u glomerulima obje skupine. Štoviše, glomeruli i proksimalni zavijeni kanalići pokazali su usporediv izražaj Notch2 između skupina tijekom vremena. Posljedično tome, nije bilo značajne razlike u postotku Notch2 pozitivnih stanica u tim područjima bubrežne kore između skupina (slika 8). Nadalje, nije bilo relevantnih razlika ni u izražaju Notch2 u odgovarajućim kortikalnim strukturama bubrega tijekom starenja (*C* 2w u odnosu na *C* 2M i *DM* 2w u odnosu na *DM* 2M). Veći udio Notch2-pozitivnih stanica primijećen je samo u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičke skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom u obje vremenske točke ($p < 0,001$), sa značajno većom razlikom zabilježenom dva tjedna nakon indukcije šećerne bolesti (slika 8). DAPI nuklearno bojanje pokazalo je značajnu ko-lokalizaciju Snail i Notch2 u distalnim zavijenim kanalićima, a u manjoj mjeri i u proksimalnim zavijenim kanalićima. S druge strane, nije bilo ko-lokalizacije ovih gena u glomerularnim stanicama (slika 10d). Također je urađena i semi-kvantifikacija bojenja primarnih anti-Snail, Wnt4 i Notch2 antitijela u pojedinačnim strukturama bubrežne kore kontrolnih i dijabetičkih štakora u zadanim vremenskim intervalima koja odgovara ranije opisanim rezultatima (tablica 3).

Tablica 3. Semi-kvantifikacija intenziteta bojenja primarnih anti-Snail, Wnt4 i Notch2 antitijela u bubrežima kontrolnih i dijabetičkih štakora nakon 2 tjedna i 2 mjeseca (*C* 2w, *DM* 2w i *C* 2M, *DM* 2M); +++ jaka reaktivnost; ++ umjerena reaktivnost; + slaba reaktivnost; – bez reaktivnosti, n/a nije primjenjivo; *G*-glomeruli, *PCT*-proksimalni zavijeni kanalići, *DCT*-distalni zavijeni kanalići.

Antitijelo	Snail			Wnt4			Notch2		
	G	PCT	DCT	G	PCT	DCT	G	PCT	DCT
C 2w	+	++	++	+	++	++	+	++	+++
DM 2w	+	+++	+++	+	+++	++	+	++	++
C 2M	+	+	++	+	++	++	+	++	+++
DM 2M	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju su proučavane promjene u izražaju gena za popravak pogrešno sparene DNA – MLH1, yH2AFX, MSH2 i PMS2 kao i čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije – Snail, Notch2 i Wnt4 u bubrezima kontrolnih štakora i štakora oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 u odgovarajućim vremenskim razdobljima od 2 tjedna i 2 mjeseca. Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje je analiziralo i kvantificiralo izražaj ovih biomarkera u kratkotrajnom životinjskom modelu šećerne bolesti tipa 1.

Izražaj MLH1 gena i proteina je do sada bio istražen pretežno na području karcinogeneze, a dokazi o njegovom izražaju i ulozi u različitim drugim patološkim stanjima, uključujući šećernu bolest, su u do sada dostupnoj literaturi manjkavi. Oštećena funkcija i gubitak MLH1 kao rezultat genske mutacije primijećeni su kod HNPCC-a u Lynchovom sindromu, dok je kod nekolicine sporadičnih zloćudnih tumora ista posljedica epigenetskih promjena, najčešće hipermetilacije promotorskog mjesta MLH1 gena (134-138). Neke su studije zabilježile i korelaciju između izražaja MLH1 gena i rizika od recidiva zloćudnih tumora te Ki67 proliferacijskog indeksa (205). Osim toga, oslabljena funkcija MLH1 i drugih MMR gena pronađena je u ukupno 87 % sporadičnih karcinoma bubrega (128, 129). U našem istraživanju, MLH1 je bio gotovo 4 puta više izražen u životinja sa šećernom bolesti u odnosu na kontrolne životinje 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti. Navedenim se naglašava važnost promjena bubrežnog tkiva koje se događaju na samom početku i ranoj prezentaciji šećerne bolesti uz pojačan izražaj MLH1 kao odraz povećane stope popravka pogrešno sparene DNA u dijabetičkim bubrezima. Naši rezultati suglasni su s rezultatima istraživanja o izražaju poli [ADP-ribozne] polimeraze 1 (PARP1) kao prve molekule koja prepoznaje oštećenu DNA i sudjeluje u popravku jednolančanih prekida DNA zajedno s ostalim genima za popravak pogrešno sparene DNA s ciljem smanjenja stope spontanih mutacija. Ošina i suradnici su pokazali pojačan izražaj PARP1 u bubrezima streptozotocinom induciranih dijabetičkih štakora već 12 dana nakon indukcije šećerne bolesti kao posljedica povećane razine jednolančanih prekida DNA i ostalih oštećenja DNA koja se događaju u bubrezima dijabetičara (172). Uspoređujući kontrolnu i dijabetičku skupinu nakon 2 mjeseca, izražaj MLH1 je bio gotovo jednak i bez značajne razlike između ove dvije skupine. Takvo smanjenje izražaja MLH1 u bubrežnom tkivu životinja sa šećernom bolesti tijekom vremena je u suprotnosti s postojanom razlikom u izražaju MSH2 i yH2AFX između navedenih skupina s vremenom i trajanjem šećerne bolesti. Ova opažanja sugeriraju da se, što se izražaja MLH1 tiče, tkivo bubrega oporavlja od početne hiperglikemije i njezinih posljedica aktiviranjem određenih kompenzacijskih mehanizama, uz moguću ulogu nekih drugih molekula i ko-faktora. Slični rezultati zabilježeni su i na razini pojedinačnih struktura bubrežne kore. Naime, razina MLH1 bila je značajno viša u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima u skupini dijabetičara 2 tjedna

nakon početka šećerne bolesti, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Tijekom vremena, u razdoblju od 2 mjeseca nakon pojave šećerne bolesti, zabilježen je značajno veći izražaj MLH1 samo u distalnim zavijenim kanalicićima životinja sa šećernom bolesti dok su tubularne stanice proksimalnih kanalicića obje skupine životinja pokazale usporediv izražaj MLH1 u navedenom razdoblju. Do sada su promjene glomerularne bazalne membrane i proksimalnih zavijenih kanalicića kao posljedica tubularne hipoksije bile prepoznate kao ključan čimbenik u razvoju dijabetičke bolesti bubrega. Uloga distalnih zavijenih kanalicića u ovom stanju, unatoč njihovoj važnosti u regulaciji krvnog tlaka, homeostaze vode i acido-baznog statusa, do sada nije dovoljno ispitana. Naši rezultati odgovaraju rezultatima nekoliko nedavnih istraživanja koja su naglasila važnost distalnih zavijenih kanalicića u patofiziologiji dijabetičkih bubrežnih komplikacija. Naime, primijećen je pojačani izražaj SATB1 (engl. *special AT-rich sequence binding protein 1*) onkogena i smanjen izražaj PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*) tumor-supresorskog gena u bubrezima streptozotocinom induciranih dijabetičkih štakora, s najizraženijim promjenama zamijećenim upravo u tubularnim epitelnim stanicama distalnih zavijenih kanalicića (104). Vitlov-Uljević i suradnici pokazali su i značajna patomorfološka oštećenja i izrazitu vakuolizaciju distalnih tubularnih epitelnih stanica na modelu šećerne bolesti tipa 1, što je bilo praćeno i pojačanim izražajem SATB1 onkogena u navedenim stanicama (105). Također, dokazan je protektivan učinak poli-nezasićenih masnih kiselina (DHEA/EPA suplementacije) i 1,4-dihidropiridina na oštećenje distalnih tubularnih epitelnih stanica u uvjetima šećerne bolesti (105, 206). S druge strane, u našem istraživanju nije bilo razlike u izražaju MLH1 u glomerulima između dvije ispitivane skupine u čitavom istraživanom razdoblju. Što se komplikacija šećerne bolesti tiče, uloga MLH1 je istražena samo u dijabetičkoj retinopatiji. Duraisamy i suradnici opisali su izraženiju hipermetilaciju promotorskog mjesta MLH1 i smanjen izražaj MLH1 u bolesnika s razvijenom proliferativnom dijabetičkom retinopatijom uz potencijalnu dobrobit terapijskih strategija koje zaustavljaju metilaciju DNA u razvoju dijabetičke retinopatije, poput primjene azacitidina, si-RNA i drugih molekula, dok sama regulacija glikemije nakon inicijalne hiperglikemije u dijabetičkih pojedinaca nije ostvarila adekvatan učinak u sprječavanju progresije iste (140). Slični rezultati dobiveni su u jednoj drugoj studiji koja je opisala sličan obrazac izražaja MLH1 i MSH2 gena u stanicama mrežnice streptozotocin-induciranih dijabetičkih štakora uz zamijećen povoljan učinak porasta izražaja MLH1 na smanjenje razine sekvencijskih varijacija u tzv. D (engl. *The displacement*)-loop regiji mitohondrijske DNA u kojoj se događa najveći broj pogrešaka, dok porast razine MSH2 nije imao isti zaštitni učinak (141). Navedeno se objašnjava činjenicom da je MLH1 više vezan za mitohondrijsku DNA polimerazu γ , dok je MSH2 izraženije vezan uz nuklearnu DNA polimerazu β . Štoviše, utvrđeno je i da bi se status

metilacije mitohondrijske DNA u krvi pojedinaca sa šećernom bolesti mogao koristiti kao poseban biomarker proliferativne dijabetičke retinopatije, s ciljem što ranijeg prepoznavanja i dijagnosticiranja iste (142). Navedene promjene nisu do sada ispitane na modelu dijabetičke bolesti bubrega te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdila uloga metilacije promotorske DNA MLH1 i drugih gena za popravak pogrešno sparene DNA u razvoju i napredovanju dijabetičkih bubrežnih komplikacija.

Također, u našem istraživanju, i γ H2AFX je pokazao značajno veći izražaj kod životinja sa šećernom bolesti, i to u oba istraživana vremenska razdoblja. Osim toga, razina γ H2AFX se gotovo udvostručio u distalnim zavijenim kanalićima u eksperimentalnoj skupini 2 tjedna nakon početka šećerne bolesti, u usporedbi s kontrolama. Zanimljivo je da je ta razlika u izražaju γ H2AFX ostala nepromijenjena kroz cijelo istraživano razdoblje te je bila eminentna i u razdoblju od 2 mjeseca. S obzirom da se γ H2AFX već ustaljeno koristi kao marker dvolančanih prekida DNA u „in vitro“ uvjetima, takva pojačana regulacija γ H2AFX može biti dio odgovora na povećanu stopu dvolančanih lomova DNA i različitih drugih oštećenja DNA koja se događaju u bubrezima dijabetičara (161). Slični rezultati dobiveni su u želučanoj sluznici izloženoj *H. pylori* i nekoliko drugih karcinogena, ali također i u uzorcima različitih zloćudnih tumora, vjerojatno kao odraz izraženije apoptoze i programirane stanične smrti koja nastupa u uvjetima značajnijih oštećenja DNA koja se ne uspijevaju popraviti dostupnim mehanizmima (207). Također, u kontekstu povećane osjetljivosti dijabetičara na različite infekcije, ustanovljena je veza između oštećenja mitohondrijske DNA i limfocitne homeostaze u šećernoj bolesti. Naime, Khan i suradnici su prijavili povećan izražaj γ H2AFX i ATM gena s posljedično oštećenom mitohondrijskom DNA u limfocitima bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 (208). Što se bubrežnih komplikacija šećerne bolesti tiče, dva su neovisna istraživanja pokazala pojačan izražaj γ H2AFX u bubrežnom tkivu pojedinaca sa šećernom bolesti. Naime, izloženost mišjih glomerularnih endotelnih stanica visokim koncentracijama glukoze značajno je povećala izražaj γ H2AFX i drugih markera oksidativnog stresa i apoptoze u navedenim stanicama, s razvojem disfunkcije glomerularnih endotelnih stanica i podocita i posljedičnom mikroalbuminurijom (170). Druga skupina istraživača potvrdila je navedene rezultate na uzorcima humanih glomerularnih endotelnih stanica u kojima je uz povećanu ekspresiju γ H2AFX zabilježena i povećana razina kolagena tipa VI što se može smatrati ključnim patofiziološkim mehanizmom nastanka dijabetičke nodularne glomeruloskleroze (171). Štoviše, dokazano je da povišena razina γ H2AFX u glomerularnim endotelnim stanicama izaziva glomerularnu akumulaciju kolagena tipa IV u bubrežnim alograftima što doprinosi razvoju intraktabilne glomerularne fibroze nakon transplantacije bubrega (167). Ovaj mehanizam mogao bi objasniti potencijalnu korelaciju

između pojačane regulacije γ H2AFX u bubrezima dijabetičara i razvoja glomerularne i tubulo-intersticijske fibroze te progresije dijabetičke bolesti bubrega. Prema trenutno dostupnoj literaturi, samo je jedna studija do sada ispitala izražaj γ H2AFX gena, mRNA i proteina na istom životinjskom modelu streptozotocinom-inducirane šećerne bolesti tipa 1. Ošina i suradnici izvijestili su o pojačanoj regulaciji γ H2AFX gena u bubrezima dijabetičkih štakora pomoću antimutagena i DNA vezača 1,4-dihidropiridina AV-153, dok se izražaj γ H2AFX mRNA i histonskog proteina nije promijenio u ispitivanih dijabetičkih životinja (172). Ovaj nalaz ukazuje na važnost nekih drugih epigenetskih i post-transkripcijskih procesa u izražaju različitih gena te nameće potrebu daljnjih analiza izražaja i funkcije MMR gena, mRNA i proteina u kontekstu šećerne bolesti i njenih komplikacija. Poznato je da je protein γ H2AFX sastavni dio endotelne proliferacije i neovaskularizacije te je primijećeno da je delecija γ H2AFX rezultirala smanjenom neovaskularizacijom tumora i vaskularizacijom uzrokovanom hipoksijom tijekom proliferativne retinopatije (209). Nasuprot tome, može se pretpostaviti da povećan izražaj γ H2AFX u tkivu mrežnice može rezultirati progresivnom neovaskularizacijom mrežnice s razvojem proliferativne dijabetičke retinopatije. Izuzev promjena zabilježenih u distalnim zavijenim kanalićima, izražaj γ H2AFX u drugim komponentama bubrežne kore (proksimalni zavijeni kanalići i glomeruli) je bio sličan i bez zabilježene značajne razlike između dviju ispitivanih skupina tijekom vremena i trajanja šećerne bolesti.

U našem istraživanju, izražaj MSH2 je bio gotovo dva puta veći u kontrolnoj skupini u usporedbi s eksperimentalnom skupinom 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti. Nakon 2 mjeseca, MSH2 je ponovno bio značajno manje izražen u dijabetičkoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali s manje zabilježenom eminentnom razlikom između ove dvije skupine u odnosu na početno razdoblje. Ovakav obrazac izražaja MSH2 gena ponovno upućuje na to da se dominantno oštećenje bubrežnog tkiva javlja već 2 tjedna nakon pojave šećerne bolesti, vjerojatno kao posljedica gubitka kompenzacijskih mehanizama zahvaćenog bubrega te ukazuje na potencijalnu vrijednost intenzivnijeg antidijabetičkog liječenja u ranoj fazi bolesti. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja o izražaju SATB1 onkogenog i PTEN tumor-supresorskog gena u bubrezima štakora sa šećernom bolesti koji su pokazali značajno smanjen izražaj PTEN tumor-supresorskog gena u bubrezima dijabetičkih životinja (104). Također, od ranije je poznato djelovanje MSH2 gena koje odgovara djelovanju ostalih tumor-supresorskih gena, a utvrđena je i snažna veza između negativne ekspresije MSH2 i sporadičnog karcinoma bubrega (146). Sukladno tome, ovo perzistentno smanjenje izražaja MSH2 u bubrezima dijabetičara ukazuje na potrebu dugotrajnog praćenja pojedinaca oboljelih od šećerne bolesti tijekom starenja. S druge strane, Ahmadi i suradnici pokazali su pojačan izražaj MSH2 i ATM

gena u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 i koronarnom arterijskom bolesti, čime bi se MSH2 potencijalno mogao koristiti kao poseban dijagnostički biomarker koronarne arterijske bolesti kod ovih bolesnika, a prije same kliničke manifestacije iste (147). Osim na razini čitavog bubrega, primijećene su značajne razlike u izražaju MSH2 i usporedbom različitih struktura bubrežne kore. Naime, izražaj MSH2 je bio pretežno jako nizak u glomerulima obje ispitivane skupine, za razliku od njegovog značajno većeg izražaja zabilježenog u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima. Osim toga, izražaj MSH2 se smanjio u tubularnim epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića kontrolne skupine s vremenom, što se uobičajeno događa u normalnim hematopoetskim matičnim stanicama tijekom starenja s posljedičnom izraženijom mikrosatelitnom nestabilnošću (7). Nadalje, MSH2 je bio značajno manje izražen u proksimalnim kanalićima u skupini dijabetičara 2 tjedna nakon pojave šećerne bolesti, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Iako je izražaj MSH2 ostao nepromijenjen u proksimalnim kanalićima dijabetičkih životinja s vremenom i trajanjem šećerne bolesti, njegov izražaj u proksimalnim zavijenim kanalićima kontrolne skupine smanjivao se sa starenjem, što je rezultiralo sličnim obrascem izražaja MSH2 u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini 2 mjeseca nakon indukcije. Štoviše, opažen je smanjen izražaj MSH2 u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičkih životinja u oba istraživana vremenska razdoblja, s izraženijim promjenama uočnim u početnom razdoblju od 2 tjedna od prezentacije šećerne bolesti. Navedeni rezultati ponovno impliciraju da se najznačajnije patofiziološke promjene bubrežne kore događaju već dva tjedna nakon pojave šećerne bolesti, osobito u proksimalnim zavijenim kanalićima s moguće posljedično poremećenom reapsorpcijom glukoze preko glukoza-natrij kotransportera koja se odvija u ovim stanicama. Specifična uloga gena za popravak pogrešno sparene DNA u popravku mitohondrijske DNA još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Uočeno je da bi oštećenje MMR sustava kroz snižene razine MSH2 i MLH1 u endotelnim stanicama mrežnice moglo biti jedan od glavnih patogenetskih mehanizama u razvoju proliferativne dijabetičke retinopatije kao druge mikrovaskularne komplikacije šećerne bolesti (141). Sukladno tome, moglo bi se pretpostaviti da slične promjene sa sniženom razinom MSH2 u bubrežnom tkivu također doprinose i razvoju dijabetičke bolesti bubrega. Štoviše, MSH2 bi mogao biti uključen ne samo u razvoj dijabetičkih mikrovaskularnih komplikacija, već i u prekomjerni upalni odgovor domaćina s posljedičnim odgođenim oporavkom. Ramirez i suradnici su pokazali da *Staphylococcus Aureus* inhibira zacjeljivanje rana kod dijabetičkih ulkusa i dijabetičkog stopala indukcijom specifične miR-15b-5p mikroRNA i naknadnom supresijom MSH2 i inhibicijom popravka DNA (148).

U ljudskom organizmu, PMS2 je slabo izražen u većini tkiva, osim u staničnoj jezgri enterocita gdje je pojačano eksprimiran. Posljedično tome, utvrđeno je da su somatske mutacije

PMS2 gena snažno povezane s HNPCC-om u Lynchovom sindromu (126). U našem istraživanju, zabilježena je značajna ko-lokalizacija između PMS2 i MSH2 u mnogim analiziranim bubrežnim strukturama sa posljedično ukupno smanjenim izražajem PMS2 kod životinja sa šećernom bolesti, u usporedbi s kontrolama. Unatoč tome, bubrežna ekspresija PMS2 bila je gotovo jednaka između dvije ispitivane skupine tijekom cijelog razdoblja praćenja što predstavlja PMS2 kao neosjetljiv biomarker za bubrežne promjene u šećernoj bolesti, uključujući dijabetičku bolest bubrega. Navedeno ujedno implicira i potrebu daljnjih istraživanja različitih drugih gena koji sudjeluju u procesu prepoznavanja i popravka pogrešno sparene DNA kako bi se u budućnosti mogle identificirati osobe sa šećernom bolesti kod kojih postoji povećani rizik od razvoja kroničnih bubrežnih komplikacija. Slično drugim genima za popravak pogrešno sparene DNA, razina PMS2 u glomerulima bila je niska u obje skupine, u usporedbi s tubularnim epitelnim stanicama. Nadalje, razina PMS2 smanjila se u distalnim zavijenim kanalićima kontrolnih životinja tijekom starenja, dok je razina PMS2 u drugim područjima bubrega ostala nepromijenjena tijekom vremena. Što se eksperimentalnih životinja tiče, PMS2 je bio manje izražen u glomerularnim i tubularnim stanicama distalnih zavijenih kanalića s vremenom i trajanjem šećerne bolesti. Zanimljivo, dok nije bilo značajne razlike u izražaju PMS2 u glomerulima između kontrolne i dijabetičke skupine 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti, izražaj PMS2 u glomerulima je bio gotovo tri puta manji u dijabetičkoj skupini nakon 2 mjeseca. Ovaj nalaz ukazuje na to da se glomerularne promjene povezane sa šećernom bolesti, za razliku od ranih promjena zabilježenih u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima, javljaju kasnije s mogućim oštećenjem glomerularne bazalne membrane i posljedičnom mikroalbuminurijom. Među svim genima za popravak pogrešno sparene DNA, gubitak PMS2 pronađen je u izrazito visokom postotku sporadičnih karcinoma gornjeg mokraćnog sustava, što može definirati PMS2 kao mogući dijagnostički biomarker, ali također i dobar prognostički čimbenik karcinoma bubrega (210). Dodatno, navedene promjene još jednom ukazuju na činjenicu da dugotrajna hiperglikemija može doprinijeti razvoju karcinoma bubrega kod pojedinaca oboljelih od šećerne bolesti, što je od ranije prepoznato u nekolicini istraživanja (128, 129, 131).

Uvažavajući prethodne spoznaje o ulozi epitelno-mezenhimalne tranzicije u razvoju bubrežne fibroze i poticanju napredovanja dijabetičke bolesti bubrega do završnih stadija kronične bubrežne bolesti, u ovom istraživanju ispitivali smo i promjene u izražaju čimbenika povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom – Snail, Wnt4 i Notch2 u bubrezima štakora sa šećernom bolesti i zdravih štakora kako bi se istražila njihova potencijalna uloga u razvoju i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega.

U našem istraživanju Snail je bio pretežno lokaliziran u citoplazmi i perinuklearnom području glomerularnih i tubularnih epitelnih stanica u obje ispitivane skupine. Ovaj obrazac izražaja Snail gena korelira s prethodnim otkrićima o relativno kratkom citoplazmatskom poluzivotu Snaila i njegovoj nuklearnoj translokaciji nakon što biva aktiviran da izvrši svoju funkciju kao član Zinc-finger 1 obitelji transkripcijskih faktora (187). Snail je važan regulatorni transkripcijski čimbenik epitelno-mezenhimalne tranzicije tijekom embrionalnog razvoja i metastaziranja različitih vrsta zloćudnih tumora, ali također je poznato da ima ključnu ulogu u fibrozi bubrega te je sukladno tome povezan s razvojem više kroničnih nefropatija, uključujući dijabetičku nefropatiju (188). U ovom istraživanju, uočena je značajno veća razina Snaila kod jedinki sa šećernom bolesti u usporedbi s kontrolama dva tjedna nakon indukcije šećerne bolesti, na razini čitavog bubrega, ali i u sve tri analizirane bubrežne kortikalne strukture (glomeruli, proksimalni i distalni zavijeni kanalići), vjerojatno kao odraz povećanog intenziteta glomerularnog i tubularnog procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije u dijabetičkim bubrezima, najizraženije u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima. Naši rezultati sukladni su rezultatima dobivenim proučavanjem utjecaja visoke razine glukoze i hipoksije na bubrežni izražaj Snaila. Sumual Siska i suradnici su pokazali da hipoksija i hiperglikemija induciraju izražaj Snaila u stanicama proksimalnih zavijenih kanalića čovjeka kroz različite signalne putove, neovisno o Notch signalizaciji (189). Veći postotak Snail pozitivnih stanica uočen je u dijabetičkim glomerulima dva tjedna nakon početka šećerne bolesti. Slični rezultati primijećeni su u proučavanju izražaja SRF (*engl. serum-response factor*) proteina kao transkripcijskog čimbenika, proteina koji veže DNA te proteina koji regulira epitelno-mezenhimalnu tranziciju podocita (211). Dokazano je da prekomjeren izražaj SRF-a u podocitima značajno povećava regulaciju Snaila s posljedičnom disfunkcijom podocita. Štoviše, inhibicija SRF-a specifičnim inhibitorom značajno je smanjila izražaj Snaila u glomerularnim stanicama, smanjila epitelno-mezenhimalnu tranziciju podocita i poboljšala proteinuriju kod dijabetičara. Druga skupina istraživača utvrdila je da je angiotenzin II u kultiviranim ljudskim podocitima pospješio translokaciju Snail proteina u jezgru i značajno povećao razinu Snaila putem aktivacije Notch 1, čime se naglašava funkcija angiotenzina II u razvoju dijabetičke bolesti bubrega, a ujedno i napominje važna uloga farmakološke inhibicije renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava u pacijenata s dijabetičkim bubrežnim komplikacijama (212). S druge strane, budući da se glomerularna razina Snaila u skupini dijabetičara smanjivala s vremenom i trajanjem šećerne bolesti, glomerularne stanice obje ispitivane skupine pokazale su sličan obrazac izražaja Snaila nakon dva mjeseca. Štoviše, kada smo usporedili kontrolnu i dijabetičku skupinu dva mjeseca nakon početka šećerne bolesti, izražaj Snaila na razini čitavog bubrega je bio gotovo jednak

između skupina. Ovakva silazna regulacija Snaila u bubrežima dijabetičara tijekom vremena je u kontrastu s postojanom razlikom u izražaju Wnt4 uočenom između dviju životinjskih skupina tijekom razdoblja istraživanja. Ova zapažanja sugeriraju da se, slično obrascu izražaja MLH1, što se izražaja Snaila tiče, bubrežno tkivo potencijalno oporavlja od početnog oštećenja izazvanog hiperglikemijom induciranim oksidativnim stresom. Uspoređujući različite kortikalne strukture bubrega u razdoblju nakon dva mjeseca, povećana razina Snaila bila je evidentna samo u tubularnim epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića životinja sa šećernom bolesti. Ovi rezultati naglašavaju ulogu Snail signalnog puta u dugotrajnom procesu tubularne epitelno-mezenhimalne tranzicije te su isti kompatibilni s prethodnim izvješćima koja su ukazala na važnost promjena proksimalnih i distalnih tubularnih epitelnih stanica u razvoju dijabetičke bolesti bubrega (104, 105). Dodatno, Kai-Yun Fang i suradnici primijetili su statistički značajno povećanje izražaja Snail mRNA i proteina u bubrežnim tubulima štakora dijabetičara kao i o vremenu ovisno smanjenje izražaja Snaila u bubrežima štakora tretiranih inzulinom (213). Štoviše, brojne studije su pokazale zaštitni učinak različitih farmakoloških sredstava i molekula na bubrežnu funkciju kod dijabetičke bubrežne bolesti koji se ostvaruje inhibicijom Notch/Snail signalnog puta i slabljenjem procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije, poput berberina, glikvidona, melatonina i drugih (204, 214, 215).

Do sada je otkriveno 19 različitih Wnt liganada i 15 Wnt receptora i koreceptora, što čini razumijevanje i definiranje specifične funkcije svakog od navedenih receptora i liganda u složenim molekularnim procesima reguliranim Wnt signalizacijom posebno izazovnim (190). Wnt4 ima ključnu ulogu u razvoju bubrega tijekom embriogeneze kao i u procesu regeneracije tubularnih epitelnih stanica u odraslim bubrežima (191, 216). Privremena i kratkotrajna aktivacija Wnt/ β -katenin signalnog puta stimulira popravak tkiva i regeneraciju stanica nakon akutne ishemijsko-reperfuzijske ozljede bubrega, dok njegova produljena aktivacija pridonosi bubrežnoj intersticijskoj fibrozi i dovodi do progresije kronične bubrežne bolesti (217). U našem istraživanju, životinje sa šećernom bolesti pokazale su značajno veći izražaj Wnt4 dva tjedna i dva mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti. Na razini pojedinačnih kortikalnih struktura povećana razina Wnt4 primijećena je samo u proksimalnim zavijenim kanalićima u skupini dijabetičara dva tjedna nakon početka šećerne bolesti. Ta je razlika ostala gotovo nepromijenjena tijekom vremena te je ista zabilježena i u razdoblju nakon dva mjeseca. Osim toga, budući da je Wnt4 pokazao rastući uzorak izražaja u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičkih životinja s vremenom, veći postotak Wnt4 pozitivnih stanica viđen je u distalnim zavijenim kanalićima eksperimentalne skupine nakon dva mjeseca, vjerojatno posljedično povećanom intenzitetu epitelno-mezenhimalne tranzicije tubularnih epitelnih stanica u uvjetima šećerne bolesti. U skladu

s našim rezultatima, Weichun He i suradnici otkrili su povišenu razinu različitih Wnt liganada, uključujući Wnt4, u fibrotičnom bubregu nakon jednostrane ureteralne opstrukcije (218). Opisana je dvostruka uloga Wnt/ β -katenin signalizacije u patogenezi dijabetičke bolesti bubrega. Nekoliko je studija pokazalo povećan izražaj Wnt4 u stanicama bubrežnih kanalića štakora sa šećernom bolesti (219-221). Štoviše, jedno je nedavno istraživanje ukazalo na važnost pojačane aktivacije Wnt/ β -katenin signalnog puta u pojavi i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega (222). U njihovom istraživanju, alkaloid trigonelin smanjio je oštećenja uzrokovana hiperglikemijom i apoptozu mezangijalnih stanica potiskivanjem aktivacije Wnt/ β -katenin signalnog puta s posljedičnim zaštitnim učinkom na funkciju bubrega. S druge strane, nekoliko istraživanja izvijestilo je o povećanoj apoptozi mezangijalnih stanica u bubrezima dijabetičara koja se ostvaruje inhibicijom Wnt/ β -katenin signalizacije i regulacijom izražaja Wnt4 mRNA i proteina u tim stanicama (223, 224). Iako ovi nalazi neminovno pokazuju da je Wnt4 bitan modulator razvoja bubrežne fibroze, gore navedeni nedosljedni rezultati sugeriraju da upravo održavanje Wnt4/ β -katenin signalizacije u uravnoteženom stanju može spriječiti proces tubularne epitelno-mezenhimalne tranzicije i progresiju bubrežne intersticijske fibroze. Štoviše, dosadašnje spoznaje upućuju i na to da bi učinak Wnt4 u dijabetičkoj bolesti bubrega mogao dodatno biti posredovan kroz nekanonski Wnt signalni put, neovisno o β -kateninu. Slično Notch2, razina Wnt4 u glomerularnim stanicama bila je niska u svim skupinama u usporedbi s tubularnim stanicama, bez uočenih razlika između dviju ispitivanih skupina. Suprotno našim rezultatima, drugi su izvijestili o porastu aktivnosti i izražaja nekolicine Wnt receptora i liganada u glomerulima mišjih modela različitih oblika kronične bubrežne bolesti. Naime, Dai C. i suradnici su u svom istraživanju naveli da delecija β -katenina specifična za podocyte štiti mišveve od ozljede podocita izazvanih adriamicinom i ublažava mikroalbuminuriju (225). Upravo suprotno, druga istraživačka skupina otkrila je da genetska delecija β -katenina u podocitima nije zaštitila mišveve od razvoja dijabetičke glomeruloskleroze budući da je smanjena Wnt/ β -katenin signalizacija bila neophodna za diferencijaciju podocita, ali je sekundarno uzrokovala i veću stopu apoptoze podocita u pokusnih životinja (226). Uzimajući u obzir ove kontradiktorne rezultate, potrebna su daljnja istraživanja o ulozi Wnt4/ β -katenin signalnog puta u razvoju kroničnih bubrežnih dijabetičkih komplikacija.

Notch signalni put ima važnu ulogu u staničnoj proliferaciji i preživljavanju, posebno tijekom embriogeneze bubrega (196, 201). Posljedično tome, mutacije Jagged1 kao Notch liganda i Notch2, jednog od četiri dobro poznata Notch transmembranska receptora, uzrokuju abnormalnosti u razvoju bubrega kod ljudi (227). Očekivano, kada je razvoj bubrega završen, ekspresija proteina Notch puta je uglavnom potisnuta i aktivna ponajviše u populaciji matičnih stanica u odraslim bubrezima (228). U korelaciji s tim, primijetili smo da je u našim uzorcima

Notch2 pronađen u relativno maloj količini u bubrezima obiju ispitivanih skupina u dvije analizirane vremenske točke. Štoviše, izražaj Notch2 na razini bubrega nije se mijenjao tijekom cijelog razdoblja istraživanja te nisu primijećene značajne razlike između skupina. Ovi nalazi predstavljaju Notch2 kao neosjetljivi biomarker za bubrežni proces epitelno-mezenhimalne tranzicije i fibrozu bubrega kod šećerne bolesti. S druge strane, Notch signalni put snažno je povećan u podocitima i tubularnim epitelnim stanicama bolesnika s različitim oblicima kronične bubrežne bolesti, gdje djeluje kao snažan regulator glavnih transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimalne tranzicije s poticanjem progresije bubrežne intersticijske fibroze (229, 230). Nekoliko je istraživanja utvrdilo povezanost između povećanja izražaja Notch 1, 3 i 4 u bubrežnom tkivu i razvoja dijabetičke bolesti bubrega (202, 230). Štoviše, jedna nedavna studija definirala je Notch2 i Jagged1 kao moguće biomarkere za razlikovanje umjerenih i teških stadija dijabetičke bolesti bubrega (231). Iako prethodna istraživanja snažno podržavaju ulogu Notch signalizacije u razvoju bubrežne fibroze, ona nisu definirala specifični ligand i receptor odgovoran za napredovanje iste u različitim patologijama, uključujući šećernu bolest. U ovom istraživanju, usporedbom različitih komponenti bubrežne kore, veća razina Notch2 primijećena je samo u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičkih životinja u oba ispitivana razdoblja, s izraženijim promjenama uočenim 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti. Dobiveni nalazi, baš kao i prethodni, ponovno naglašavaju važnost početnog oštećenja bubrežnog tkiva koje nastaje u uvjetima šećerne bolesti uz potencijalnu vrijednost intenzivnijeg antidijabetičkog liječenja i striktno kontrole hiperglikemije u ranoj prezentaciji bolesti s ciljem očuvanja funkcije bubrega i sprječavanja napredovanja dijabetičke bolesti bubrega do završnih stadija kronične bubrežne bolesti. Dodatno, ovi rezultati mogu implicirati važnu ulogu transmembranskog receptora Notch2 u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije distalnih tubularnih epitelnih stanica kod dijabetičke bubrežne bolesti. S druge strane, nisu uočene značajne razlike između skupina u pogledu izražaja Notch2 u glomerulima i proksimalnim zavijenim kanalićima. Ovi su nalazi u skladu s rezultatima istraživanja koje je pokazalo da je genetska delecija Notch1 specifična za podocyte dovela do ublažavanja mikroalbuminurije, dok genetska delecija Notch2 u podocitima nije imala učinka na mikroalbuminuriju i progresiju dijabetičke bolesti bubrega (203).

Potrebna su dodatna istraživanja promjena u izražaju različitih gena za popravak pogrešno sparene DNA i čimbenika povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom u bubrežnom tkivu u uvjetima hiperglikemije, što će omogućiti rasvjetljavanje njihove uloge u razvoju i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega te poticanju bubrežne karcinogeneze u pojedinaca sa šećernom bolesti, ali također i omogućiti razvoj novih terapijskih modaliteta u liječenju ovog globalnog i potencijalno po život opasnog stanja.

6. ZAKLJUČCI

Naši rezultati pokazuju da se promjene u bubrežnom izražaju ispitivanih gena za popravak pogrešno sparene DNA i čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije događaju već 2 tjedna nakon početka šećerne bolesti, najizraženije u tubularnim epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića. Navedeno ukazuje na važnost ranih patomorfoloških promjena bubrežnog parenhima koje se događaju u uvjetima hiperglikemije te implicira korist intenzivnijeg antidijabetičkog liječenja i što efikasnije kontrole hiperglikemije na samom početku šećerne bolesti. Također, navedeni rezultati ujedno upućuju i na važnu ulogu tubularnih epitelnih stanica u patofiziologiji dijabetičke bubrežne bolesti, što je u suprotnosti s prethodnim uvjerenjima da je disfunkcija podocita uz promjene glomerularne bazalne membrane s posljedičnom mikroalbuminurijom početno mjesto oštećenja i ključan događaj u razvoju dijabetičkih bubrežnih komplikacija. Naši rezultati naglašavaju važnost gena za popravak pogrešno sparene DNA i čimbenika epitelno-mezenhimalne tranzicije u patofiziologiji dijabetičkih bubrežnih komplikacija uz mogućnost njihovog korištenja kao dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera dijabetičke bolesti bubrega. Štoviše, navedeni podaci bi mogli ukazati na moguću vezu između kroničnih dijabetičkih bubrežnih komplikacija i bubrežne karcinogeneze kod dijabetičara, budući da su zamijećene promjene u izražaju gena za popravak pogrešno sparene DNA u kori bubrega štakora sa šećernom bolesti tipa 1, a uvažavajući njihovu od ranije poznatu ulogu u procesu karcinogeneze. Nadalje, dobiveni rezultati mogli bi pomoći u razvoju ranih terapijskih modaliteta na samom početku šećerne bolesti s mogućim dugoročnim zaštitnim učinkom bubrežnog tkiva i funkcije bubrega, a sve u cilju usporavanja ili otklanjanja razvoja završnog stadija kroničnog bubrežnog zatajenja.

7. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi izražaj MLH1, MSH2, PMS2 i yH2AFX kao gena za popravak pogrešno sparene DNA (MMR) te Snail, Wnt4 i Notch2 kao transkripcijskih čimbenika povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (EMT) u različitim strukturama bubrega dijabetičkih štakora: glomeruli (G), proksimalni i distalni zavijeni kanalići (PCT; DCT). Metode: Mužjacima štakora Sprague Dawley instilirano je 55 mg/kg streptozotocina (model šećerne bolesti tipa I, DM skupina) ili citratni pufer (kontrolna skupina). Uzorci bubrega prikupljeni su 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti i obrađeni za imunohistokemiju. Rezultati: Životinje sa šećernom bolesti pokazale su nižu razinu MSH2 i veću razinu yH2AFX i Wnt4 u bubrezima 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije DM, dok se izražaj MLH1 i Snail-a značajno povećao samo 2 tjedna nakon inicijacije DM ($p < 0,0001$). Najznačajnije razlike uočene su u tubularnim epitelnim stanicama u razdoblju od 2 tjedna nakon indukcije, s nižim izražajem MSH2 i većim izražajem MLH1, Snail i Wnt4 u proksimalnim zavijenim kanalićima, kao i smanjenim izražajem MSH2 i povećanim izražajem MLH1, yH2AFX, Snail i Notch2 u distalnim zavijenim kanalićima dijabetičkih životinja ($p < 0,0001$; $p < 0,001$). Zaključak: Dobiveni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu MMR gena i čimbenika povezanih s EMT-om u razvoju i progresiji dijabetičke bolesti bubrega, kao i na moguću vezu između šećerne bolesti i bubrežne karcinogeneze. Promjene u njihovom izražaju, posebno u tubularnim stanicama, mogle bi poslužiti kao dijagnostički biomarkeri za ranu fazu šećerne bolesti, ali i doprinijeti razvoju novih terapijskih modaliteta u ovom stanju.

8. SUMMARY

The aim of this study was to determine the expression of mismatch repair genes (MMR) - MLH1, MSH2, PMS2 and γ H2AFX and epithelial to mesenchymal transition (EMT) related transcription factors Snail, Wnt4, and Notch2 in different renal areas of diabetic rats: glomeruli (G), proximal and distal convoluted tubules (PCT; DCT). Methods: Male Sprague Dawley rats were instilled with 55mg/kg streptozotocin (diabetes mellitus type I model, DM group) or citrate buffer (control group). Kidney samples were collected 2 weeks and 2 months after DM induction and processed for immunohistochemistry. Results: Diabetic animals showed lower MSH2 and higher γ H2AFX and Wnt4 kidney expression both 2 weeks and 2 months post-DM induction, while MLH1 and Snail expression significantly increased only 2 weeks after DM initiation ($p < 0.0001$). The most substantial differences were observed in tubular epithelial cells in the period of 2 weeks after induction, with lower MSH2 and higher MLH1, Snail and Wnt4 expression in PCT and repeatedly decreased MSH2 and increased MLH1, γ H2AFX, Snail and Notch2 expression in DCT of diabetic animals ($p < 0.0001$; $p < 0.001$). Conclusion: The obtained results point to the MMR genes and EMT related factors as a potential contributors to diabetic kidney disease development and progression, as well as the possible link between DM and the renal carcinogenesis. Changes in their expression, especially in PCT and DCT, could serve as diagnostic biomarkers for early stages of DM, and might be a promising novel therapeutic target in this condition.

9. LITERATURA

1. Glodny B, Unterholzner V, Taferner B, Hofmann KJ, Rehder P, Strasak A, et al. Normal kidney size and its influencing factors - a 64-slice MDCT study of 1.040 asymptomatic patients. *BMC Urol.* 2009;9:19.
2. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J.* 1998;68(5):800, 3-16, 19-20; quiz 21-4.
3. Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(6):898-910.
4. Glasscock RJ, Rule AD. Aging and the Kidneys: Anatomy, Physiology and Consequences for Defining Chronic Kidney Disease. *Nephron.* 2016;134(1):25-9.
5. Vallon V, Thomson SC. The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(6):317-36.
6. Hotait ZS, Lo Cascio JN, Choos END, Shepard BD. The sugar daddy: the role of the renal proximal tubule in glucose homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;323(3):C791-C803.
7. Imenez Silva PH, Mohebbi N. Kidney metabolism and acid-base control: back to the basics. *Pflugers Arch.* 2022;474(8):919-34.
8. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(7):1257-72.
9. Peacock M. Phosphate Metabolism in Health and Disease. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(1):3-15.
10. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:317-25.
11. Zappulo F, Cappuccilli M, Cingolani A, Scrivo A, Chiocchini ALC, Nunzio MD, et al. Vitamin D and the Kidney: Two Players, One Console. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16).
12. Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(11):955-63.
13. Cornec-Le Gall E, Alam A, Perrone RD. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet.* 2019;393(10174):919-35.
14. Edvardsson VO, Goldfarb DS, Lieske JC, Beara-Lasic L, Anglani F, Milliner DS, et al. Hereditary causes of kidney stones and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(10):1923-42.
15. Nozu K, Nakanishi K, Abe Y, Udagawa T, Okada S, Okamoto T, et al. A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. *Clin Exp Nephrol.* 2019;23(2):158-68.

16. Anders HJ, Huber TB, Isermann B, Schiffer M. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(6):361-77.
17. Grewal MK, Adams MD, Valentini RP. Vasculitis and Kidney Disease. *Pediatr Clin North Am*. 2022;69(6):1199-217.
18. Ferenbach DA, Bonventre JV. Acute kidney injury and chronic kidney disease: From the laboratory to the clinic. *Nephrol Ther*. 2016;12 Suppl 1(Suppl 1):S41-8.
19. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders HJ. Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):52.
20. Mercado MG, Smith DK, Guard EL. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2019;100(11):687-94.
21. Molitoris BA. Low-Flow Acute Kidney Injury: The Pathophysiology of Prerenal Azotemia, Abdominal Compartment Syndrome, and Obstructive Uropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2022;17(7):1039-49.
22. Meola M, Samoni S, Petrucci I, Ronco C. Clinical Scenarios in Acute Kidney Injury: Post-Renal Acute Kidney Injury. *Contrib Nephrol*. 2016;188:64-8.
23. Devarajan P. Pathogenesis of intrinsic acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr*. 2023;35(2):234-8.
24. Perazella MA. Pharmacology behind Common Drug Nephrotoxicities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(12):1897-908.
25. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-52.
26. Olsen E, van Galen G. Chronic Renal Failure-Causes, Clinical Findings, Treatments and Prognosis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2022;38(1):25-46.
27. Padmanabhan A, Gohil S, Gadgil NM, Sachdeva P. Chronic renal failure: An autopsy study. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2017;28(3):545-51.
28. Al-Wahsh H, Lam NN, Quinn RR, Ronksley PE, Sood MM, Hemmelgarn B, et al. Calculated versus measured albumin-creatinine ratio to predict kidney failure and death in people with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2022;101(6):1260-70.
29. Zhong J, Yang HC, Fogo AB. A perspective on chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(3):F375-F84.
30. Wouk N. End-Stage Renal Disease: Medical Management. *Am Fam Physician*. 2021;104(5):493-9.
31. Brunet P. [Treatment of chronic kidney failure by haemodialysis]. *Soins*. 2018;63(826):21-3.

32. Brzoska MM, Kaminski M, Dziki M, Moniuszko-Jakoniuk J. Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. II. Histoenzymatic studies. *Arch Toxicol.* 2004;78(4):226-31.
33. Tanabe M, Shimizu A, Masuda Y, Kataoka M, Ishikawa A, Wakamatsu K, et al. Development of lymphatic vasculature and morphological characterization in rat kidney. *Clin Exp Nephrol.* 2012;16(6):833-42.
34. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
35. Ali MK, Pearson-Stuttard J, Selvin E, Gregg EW. Interpreting global trends in type 2 diabetes complications and mortality. *Diabetologia.* 2022;65(1):3-13.
36. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J.* 2016;92(1084):63-9.
37. Norton L, Shannon C, Gastaldelli A, DeFronzo RA. Insulin: The master regulator of glucose metabolism. *Metabolism.* 2022;129:155142.
38. Haedersdal S, Lund A, Knop FK, Vilsboll T. The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(2):217-39.
39. Marette A. The fascinating physiology of insulin: celebrating a centennial hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021;320(1):E1.
40. Nyenwe EA, Kitabchi AE. The evolution of diabetic ketoacidosis: An update of its etiology, pathogenesis and management. *Metabolism.* 2016;65(4):507-21.
41. Alsahli M, Gerich JE. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;133:1-9.
42. Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014;122(7):384-6.
43. Cloete L. Diabetes mellitus: an overview of the types, symptoms, complications and management. *Nurs Stand.* 2022;37(1):61-6.
44. Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert C, Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes.* 2018;42 Suppl 1:S10-S5.
45. Lee S, Liu T, Zhou J, Zhang Q, Wong WT, Tse G. Predictions of diabetes complications and mortality using hba1c variability: a 10-year observational cohort study. *Acta Diabetol.* 2021;58(2):171-80.

46. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):88-98.
47. Allende-Vigo MZ. Diabetes mellitus prevention. *Am J Ther*. 2015;22(1):68-72.
48. Baek HS, Park JY, Yu J, Lee J, Yang Y, Ha J, et al. Characteristics of Glycemic Control and Long-Term Complications in Patients with Young-Onset Type 2 Diabetes (Endocrinol Metab 2022;37:641-51, Han-sang Baek et al.). *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2022;37(6):945-6.
49. Petersmann A, Muller-Wieland D, Muller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;127(S 01):S1-S7.
50. Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(11):743-54.
51. Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, Brunetti A. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(9):899-909.
52. Lende M, Rijhsinghani A. Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24).
53. Vasile FC, Preda A, Stefan AG, Vladu MI, Fortofoiu MC, Clenciu D, et al. An Update of Medical Nutrition Therapy in Gestational Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2021;2021:5266919.
54. Ye W, Luo C, Huang J, Li C, Liu Z, Liu F. Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2022;377:e067946.
55. Anik A, Catli G, Abaci A, Bober E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(3-4):251-63.
56. Kanthimathi S, Jahnavi S, Balamurugan K, Ranjani H, Sonya J, Goswami S, et al. Glucokinase gene mutations (MODY 2) in Asian Indians. *Diabetes Technol Ther*. 2014;16(3):180-5.
57. Broome DT, Pantalone KM, Kashyap SR, Philipson LH. Approach to the Patient with MODY-Monogenic Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(1):237-50.
58. Carlsson S. Etiology and Pathogenesis of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) Compared to Type 2 Diabetes. *Front Physiol*. 2019;10:320.
59. Buzzetti R, Tuomi T, Mauricio D, Pietropaolo M, Zhou Z, Pozzilli P, et al. Management of Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Consensus Statement From an International Expert Panel. *Diabetes*. 2020;69(10):2037-47.
60. Wynne K, Devereaux B, Dornhorst A. Diabetes of the exocrine pancreas. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019;34(2):346-54.

61. Barton JC, Acton RT. Diabetes in HFE Hemochromatosis. *J Diabetes Res.* 2017;2017:9826930.
62. Mazziotti G, Formenti AM, Frara S, Maffezzoni F, Doga M, Giustina A. Diabetes in Cushing Disease. *Curr Diab Rep.* 2017;17(5):32.
63. Fathallah N, Slim R, Larif S, Hmouda H, Ben Salem C. Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. *Drug Saf.* 2015;38(12):1153-68.
64. Brunton S. Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding. *J Fam Pract.* 2016;65(4 Suppl).
65. Rachdaoui N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
66. Braga T, Kraemer-Aguiar LG, Docherty NG, Le Roux CW. Treating prediabetes: why and how should we do it? *Minerva Med.* 2019;110(1):52-61.
67. Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, Gallwitz B, Kellerer M, Klein H, et al. Therapy of Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019;127(S 01):S73-S92.
68. Aschner P. Insulin Therapy in Type 2 Diabetes. *Am J Ther.* 2020;27(1):e79-e90.
69. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2018;391(10138):2449-62.
70. De Beaufort C, Besancon S, Balde N. Management of type 1 diabetes. *Med Sante Trop.* 2018;28(4):359-62.
71. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2018;19(3):346-53.
72. Zhang D, Huang J, Hu J. Improved diagnosis of type-1 diabetes mellitus using multiplexed autoantibodies ELISA array. *Anal Biochem.* 2022;649:114722.
73. Lotfy M, Adeghate J, Kalasz H, Singh J, Adeghate E. Chronic Complications of Diabetes Mellitus: A Mini Review. *Curr Diabetes Rev.* 2017;13(1):3-10.
74. Mishriky BM, Cummings DM, Powell JR. Diabetes-Related Microvascular Complications - A Practical Approach. *Prim Care.* 2022;49(2):239-54.
75. Viigimaa M, Sachinidis A, Toumpourleka M, Koutsampasopoulos K, Alliksoo S, Titma T. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol.* 2020;18(2):110-6.
76. Umpierrez G, Korytkowski M. Diabetic emergencies - ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):222-32.
77. Freeland B. Hypoglycemia in Diabetes Mellitus. *Home Healthc Now.* 2017;35(8):414-9.

78. Iqbal A, Heller S. Managing hypoglycaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(3):413-30.
79. Dhatariya KK. Defining and characterising diabetic ketoacidosis in adults. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;155:107797.
80. Dhatariya KK, Vellanki P. Treatment of Diabetic Ketoacidosis (DKA)/Hyperglycemic Hyperosmolar State (HHS): Novel Advances in the Management of Hyperglycemic Crises (UK Versus USA). *Curr Diab Rep.* 2017;17(5):33.
81. Pasquel FJ, Umpierrez GE. Hyperosmolar hyperglycemic state: a historic review of the clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Diabetes Care.* 2014;37(11):3124-31.
82. Tsai A, Teichman A, Butts CA, Cai JY, Peck GL, Adams CD, et al. Mesenteric venous thrombosis: A lethal complication of hyperglycemic crises. *Am J Health Syst Pharm.* 2021;78(2):105-7.
83. Verges B. Cardiovascular disease in type 1 diabetes: A review of epidemiological data and underlying mechanisms. *Diabetes Metab.* 2020;46(6):442-9.
84. Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Al Suwaidi J, Abi Khalil C. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7839101.
85. Li Y, Mitchell W, Elze T, Zebardast N. Association Between Diabetes, Diabetic Retinopathy, and Glaucoma. *Curr Diab Rep.* 2021;21(10):38.
86. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):42.
87. Moheet A, Mangia S, Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1353:60-71.
88. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(12):2032-45.
89. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 2018;71(6):884-95.
90. Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1497449.
91. Thethi TK, Batuman V. Challenging the conventional wisdom on diabetic nephropathy: Is microalbuminuria the earliest event? *J Diabetes Complications.* 2019;33(3):191-2.
92. Chen C, Wang C, Hu C, Han Y, Zhao L, Zhu X, et al. Normoalbuminuric diabetic kidney disease. *Front Med.* 2017;11(3):310-8.

93. McCloskey O, Maxwell AP. Diagnosis and management of nephrotic syndrome. *Practitioner*. 2017;261(1801):11-5.
94. 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.
95. Pourghasem M, Shafi H, Babazadeh Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. *Caspian J Intern Med*. 2015;6(3):120-7.
96. Takazakura A, Sakurai M, Bando Y, Misu H, Takeshita Y, Kita Y, et al. Renoprotective effects of atorvastatin compared with pravastatin on progression of early diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig*. 2015;6(3):346-53.
97. Sawaf H, Thomas G, Taliencio JJ, Nakhoul G, Vachharajani TJ, Mehdi A. Therapeutic Advances in Diabetic Nephropathy. *J Clin Med*. 2022;11(2).
98. Prattichizzo F, de Candia P, Ceriello A. Diabetes and kidney disease: emphasis on treatment with SGLT-2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists. *Metabolism*. 2021;120:154799.
99. Sugahara M, Pak WLW, Tanaka T, Tang SCW, Nangaku M. Update on diagnosis, pathophysiology, and management of diabetic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2021;26(6):491-500.
100. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc*. 2018;117(8):662-75.
101. Wu XQ, Zhang DD, Wang YN, Tan YQ, Yu XY, Zhao YY. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney. *Free Radic Biol Med*. 2021;171:260-71.
102. Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Aslani S. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. *Eur J Pharmacol*. 2018;833:158-64.
103. Hu C, Sun L, Xiao L, Han Y, Fu X, Xiong X, et al. Insights into the Mechanisms Involved in the Expression and Regulation of Extracellular Matrix Proteins in Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem*. 2015;22(24):2858-70.
104. Delic Jukic IK, Kostic S, Filipovic N, Gudelj Ensor L, Ivandic M, Dukic JJ, et al. Changes in expression of special AT-rich sequence binding protein 1 and phosphatase and tensin homologue in kidneys of diabetic rats during ageing. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(10):1734-41.
105. 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.

106. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med.* 2021;171(2):179-89.
107. Dos Santos JM, Tewari S, Mendes RH. The Role of Oxidative Stress in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *J Diabetes Res.* 2019;2019:4189813.
108. Ahmad AA, Draves SO, Rosca M. Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. *Cells.* 2021;10(11).
109. Zakaria EM, El-Maraghy NN, Ahmed AF, Ali AA, El-Bassossy HM. PARP inhibition ameliorates nephropathy in an animal model of type 2 diabetes: focus on oxidative stress, inflammation, and fibrosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017;390(6):621-31.
110. Cheprasova AA, Popov SS, Pashkov AN, Verevkin AN, Shul'gin KK. Parameters of Oxidative Stress and Activity of Antioxidant Enzymes in the Saliva of Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med.* 2022;172(5):552-7.
111. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* 2016;7(29):44879-905.
112. Wojciechowska J, Krajewski W, Bolanowski M, Krecicki T, Zatonski T. Diabetes and Cancer: a Review of Current Knowledge. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2016;124(5):263-75.
113. Graff RE, Sanchez A, Tobias DK, Rodriguez D, Barrisford GW, Blute ML, et al. Type 2 Diabetes in Relation to the Risk of Renal Cell Carcinoma Among Men and Women in Two Large Prospective Cohort Studies. *Diabetes Care.* 2018;41(7):1432-7.
114. Washio M, Mori M, Khan M, Sakauchi F, Watanabe Y, Ozasa K, et al. Diabetes mellitus and kidney cancer risk: the results of Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk (JACC Study). *Int J Urol.* 2007;14(5):393-7.
115. Carstensen B, Read SH, Friis S, Sund R, Keskimaki I, Svensson AM, et al. Cancer incidence in persons with type 1 diabetes: a five-country study of 9,000 cancers in type 1 diabetic individuals. *Diabetologia.* 2016;59(5):980-8.
116. Gupta D, Heinen CD. The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications. *DNA Repair (Amst).* 2019;78:60-9.
117. Olave MC, Graham RP. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022;61(6):314-21.
118. DuPrie ML, Palacio T, Calil FA, Kolodner RD, Putnam CD. Mlh1 interacts with both Msh2 and Msh6 for recruitment during mismatch repair. *DNA Repair (Amst).* 2022;119:103405.

119. Owen BA, W HL, McMurray CT. The nucleotide binding dynamics of human MSH2-MSH3 are lesion dependent. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(5):550-7.
120. Yang XW, Han XP, Han C, London J, Fishel R, Liu J. MutS functions as a clamp loader by positioning MutL on the DNA during mismatch repair. *Nat Commun.* 2022;13(1):5808.
121. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell.* 2006;126(2):297-308.
122. Cannavo E, Sanchez A, Anand R, Ranjha L, Hugener J, Adam C, et al. Regulation of the MLH1-MLH3 endonuclease in meiosis. *Nature.* 2020;586(7830):618-22.
123. Bommi PV, Bowen CM, Reyes-Uribe L, Wu W, Katayama H, Rocha P, et al. The Transcriptomic Landscape of Mismatch Repair-Deficient Intestinal Stem Cells. *Cancer Res.* 2021;81(10):2760-73.
124. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87 e3.
125. Roudko V, Cimen Bozkus C, Greenbaum B, Lucas A, Samstein R, Bhardwaj N. Lynch Syndrome and MSI-H Cancers: From Mechanisms to "Off-The-Shelf" Cancer Vaccines. *Front Immunol.* 2021;12:757804.
126. Biller LH, Syngal S, Yurgelun MB. Recent advances in Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2019;18(2):211-9.
127. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed.* 2018;89(9-S):97-101.
128. Baiyee D, Banner B. Mismatch repair genes in renal cortical neoplasms. *Hum Pathol.* 2006;37(2):185-9.
129. Hartmann A, Zanardo L, Bocker-Edmonston T, Blaszyk H, Dietmaier W, Stoehr R, et al. Frequent microsatellite instability in sporadic tumors of the upper urinary tract. *Cancer Res.* 2002;62(23):6796-802.
130. Bahadoram S, Davoodi M, Hassanzadeh S, Bahadoram M, Barahman M, Mafakher L. Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. *G Ital Nefrol.* 2022;39(3).
131. Leach FS, Koh M, Sharma K, McWilliams G, Talifero-Smith L, Codd A, et al. Mismatch repair gene mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(5):530-6.
132. Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2003;106(1):66-73.
133. de las Alas MM, Aebi S, Fink D, Howell SB, Los G. Loss of DNA mismatch repair: effects on the rate of mutation to drug resistance. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(20):1537-41.

134. Lagerstedt-Robinson K, Rohlin A, Aravidis C, Melin B, Nordling M, Stenmark-Askmalin M, et al. Mismatch repair gene mutation spectrum in the Swedish Lynch syndrome population. *Oncol Rep.* 2016;36(5):2823-35.
135. Lebrun C, Olschwang S, Jeannin S, Vandenbos F, Sobol H, Frenay M. Turcot syndrome confirmed with molecular analysis. *Eur J Neurol.* 2007;14(4):470-2.
136. Seng TJ, Currey N, Cooper WA, Lee CS, Chan C, Horvath L, et al. DLEC1 and MLH1 promoter methylation are associated with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Br J Cancer.* 2008;99(2):375-82.
137. Liu FX, Huang XP, Xu X, Cai Y, Han YL, Wu RL, et al. Alterations of MLH1 and microsatellite instability in esophageal squamous cell carcinomas. *Yi Chuan Xue Bao.* 2005;32(3):234-42.
138. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F, et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(15):6982-7.
139. Muller D, Telieps T, Eugster A, Weinzierl C, Jolink M, Ziegler AG, et al. Novel minor HLA DR associated antigens in type 1 diabetes. *Clin Immunol.* 2018;194:87-91.
140. Kowluru RA, Mohammad G. Epigenetics and Mitochondrial Stability in the Metabolic Memory Phenomenon Associated with Continued Progression of Diabetic Retinopathy. *Sci Rep.* 2020;10(1):6655.
141. Mishra M, Kowluru RA. Retinal mitochondrial DNA mismatch repair in the development of diabetic retinopathy, and its continued progression after termination of hyperglycemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(10):6960-7.
142. Maghbooli Z, Hossein-nezhad A, Larijani B, Amini M, Keshtkar A. Global DNA methylation as a possible biomarker for diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015;31(2):183-9.
143. Espenschied CR, LaDuca H, Li S, McFarland R, Gau CL, Hampel H. Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. *J Clin Oncol.* 2017;35(22):2568-75.
144. Xinarianos G, Liloglou T, Prime W, Sourvinos G, Karachristos A, Gosney JR, et al. p53 status correlates with the differential expression of the DNA mismatch repair protein MSH2 in non-small cell lung carcinoma. *Int J Cancer.* 2002;101(3):248-52.
145. Ripperger T, Schlegelberger B. Acute lymphoblastic leukemia and lymphoma in the context of constitutional mismatch repair deficiency syndrome. *Eur J Med Genet.* 2016;59(3):133-42.

146. Yoo KH, Won KY, Lim SJ, Park YK, Chang SG. Deficiency of MSH2 expression is associated with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;8(5):2135-9.
147. Ahmadi A, Behmanesh M, Boroumand MA, Tavallaei M. Up-regulation of MSH2, XRCC1 and ATM genes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;109(3):500-6.
148. Ramirez HA, Pastar I, Jozic I, Stojadinovic O, Stone RC, Ojeh N, et al. Staphylococcus aureus Triggers Induction of miR-15B-5P to Diminish DNA Repair and Deregulate Inflammatory Response in Diabetic Foot Ulcers. *J Invest Dermatol.* 2018;138(5):1187-96.
149. Genschel J, Kadyrova LY, Iyer RR, Dahal BK, Kadyrov FA, Modrich P. Interaction of proliferating cell nuclear antigen with PMS2 is required for MutLalpha activation and function in mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(19):4930-5.
150. Meyers M, Theodosiou M, Acharya S, Odegaard E, Wilson T, Lewis JE, et al. Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1, and hPMS2. *Cancer Res.* 1997;57(2):206-8.
151. Fedier A, Ruefenacht UB, Schwarz VA, Haller U, Fink D. Increased sensitivity of p53-deficient cells to anticancer agents due to loss of Pms2. *Br J Cancer.* 2002;87(9):1027-33.
152. Marinovic-Terzic I, Yoshioka-Yamashita A, Shimodaira H, Avdievich E, Hunton IC, Kolodner RD, et al. Apoptotic function of human PMS2 compromised by the nonsynonymous single-nucleotide polymorphic variant R20Q. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(37):13993-8.
153. Inanaga S, Igase M, Sakai Y, Tanabe M, Shimonohara N, Itamoto K, et al. Mismatch repair deficiency in canine neoplasms. *Vet Pathol.* 2021;58(6):1058-63.
154. van Oers JM, Roa S, Werling U, Liu Y, Genschel J, Hou H, Jr., et al. PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(30):13384-9.
155. Edwards RA, Witherspoon M, Wang K, Afrasiabi K, Pham T, Birnbaumer L, et al. Epigenetic repression of DNA mismatch repair by inflammation and hypoxia in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Cancer Res.* 2009;69(16):6423-9.
156. Pan X, Mizukami H, Hara Y, Yamada T, Yamazaki K, Kudoh K, et al. Diabetes mellitus impacts on expression of DNA mismatch repair protein PMS2 and tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Diabetes Investig.* 2023;14(1):132-44.
157. Bolin K, Sandling JK, Zickert A, Jonsen A, Sjowall C, Svenungsson E, et al. Association of STAT4 polymorphism with severe renal insufficiency in lupus nephritis. *PLoS One.* 2013;8(12):e84450.

158. Li A, Eirin-Lopez JM, Ausio J. H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol.* 2005;83(4):505-15.
159. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-9.
160. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42462-7.
161. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2012;920:613-26.
162. Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma.* 2009;118(6):683-92.
163. Yin B, Bassing CH. The sticky business of histone H2AX in V(D)J recombination, maintenance of genomic stability, and suppression of lymphoma. *Immunol Res.* 2008;42(1-3):29-40.
164. Ueno S, Kokura K, Kuromi Y, Osaki M, Okada F, Kitamura S, et al. Kidney organoid derived from renal tissue stem cells is a useful tool for histopathological assessment of nephrotoxicity in a cisplatin-induced acute renal tubular injury model. *J Toxicol Pathol.* 2022;35(4):333-43.
165. Koike M, Sugasawa J, Yasuda M, Koike A. Tissue-specific DNA-PK-dependent H2AX phosphorylation and gamma-H2AX elimination after X-irradiation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(1):52-5.
166. Zhang JQJ, Saravanabavan S, Chandra AN, Munt A, Wong ATY, Harris PC, et al. Up-Regulation of DNA Damage Response Signaling in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Pathol.* 2021;191(5):902-20.
167. Matsui Y, Sunatani Y, Hayashi N, Okino K, Okushi Y, Mukai K, et al. DNA double-strand breaks induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. *Clin Exp Nephrol.* 2016;20(3):479-88.
168. Giovannini C, Piaggi S, Federico G, Scarpato R. High levels of gamma-H2AX foci and cell membrane oxidation in adolescents with type 1 diabetes. *Mutat Res.* 2014;770:128-35.
169. She QY, Zhu Y, Chen G, Liu Y, Ruan CX, Wang Q, et al. In vitro assessment of the DNA damage and senility of CD117+ stem cells collected from diabetic mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022;26(4):1084-90.
170. Casalena GA, Yu L, Gil R, Rodriguez S, Sosa S, Janssen W, et al. The diabetic microenvironment causes mitochondrial oxidative stress in glomerular endothelial cells and pathological crosstalk with podocytes. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):105.

171. Fujii A, Sunatani Y, Furuichi K, Fujimoto K, Adachi H, Iwabuchi K, et al. DNA damage in human glomerular endothelial cells induces nodular glomerulosclerosis via an ATR and ANXA2 pathway. *Sci Rep.* 2020;10(1):22206.
172. Osina K, Rostoka E, Isajevs S, Sokolovska J, Sjakste T, Sjakste N. Effects of an Antimutagenic 1,4-Dihydropyridine AV-153 on Expression of Nitric Oxide Synthases and DNA Repair-related Enzymes and Genes in Kidneys of Rats with a Streptozotocin Model of Diabetes Mellitus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;119(5):458-63.
173. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.
174. Jayachandran J, Srinivasan H, Mani KP. Molecular mechanism involved in epithelial to mesenchymal transition. *Arch Biochem Biophys.* 2021;710:108984.
175. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:395-412.
176. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells.* 2021;10(7).
177. Llorian-Salvador M, Byrne EM, Szczepan M, Little K, Chen M, Xu H. Complement activation contributes to subretinal fibrosis through the induction of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in retinal pigment epithelial cells. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):182.
178. Mirzaei S, Abadi AJ, Gholami MH, Hashemi F, Zabolian A, Hushmandi K, et al. The involvement of epithelial-to-mesenchymal transition in doxorubicin resistance: Possible molecular targets. *Eur J Pharmacol.* 2021;908:174344.
179. Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, Steinbichler TB, Riechelmann H. Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells.* 2020;9(2).
180. Jindal A, Thadi A, Shailubhai K. Hepatocellular Carcinoma: Etiology and Current and Future Drugs. *J Clin Exp Hepatol.* 2019;9(2):221-32.
181. Kim J, Hwan Kim S. CK2 inhibitor CX-4945 blocks TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in A549 human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 2013;8(9):e74342.
182. Sun YB, Qu X, Caruana G, Li J. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation.* 2016;92(3):102-7.
183. Yuan Q, Tan RJ, Liu Y. Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:253-83.

184. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015;21(9):998-1009.
185. Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(10):681-95.
186. Li Y, Hu Q, Li C, Liang K, Xiang Y, Hsiao H, et al. PTEN-induced partial epithelial-mesenchymal transition drives diabetic kidney disease. *J Clin Invest.* 2019;129(3):1129-51.
187. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2013;13(9):963-72.
188. Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* 2006;25(23):5603-13.
189. Sumual S, Saad S, Tang O, Yong R, McGinn S, Chen XM, et al. Differential regulation of Snail by hypoxia and hyperglycemia in human proximal tubule cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1689-97.
190. Nusse R. Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(5).
191. Rim EY, Clevers H, Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. *Annu Rev Biochem.* 2022;91:571-98.
192. Wang M, Marco P, Capra V, Kibar Z. Update on the Role of the Non-Canonical Wnt/Planar Cell Polarity Pathway in Neural Tube Defects. *Cells.* 2019;8(10).
193. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017;36(11):1461-73.
194. Qin Y, Chen M, Yang Y, Zhou XR, Shao SY, Wang DW, et al. Liraglutide improves hepatic insulin resistance via the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2018;17(5):7372-80.
195. Tung CW, Hsu YC, Shih YH, Chang PJ, Lin CL. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton).* 2018;23 Suppl 4:32-7.
196. D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol.* 2010;92:73-129.
197. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284(5415):770-6.
198. Reichrath J, Reichrath S. Notch Signaling and Tissue Patterning in Embryology: An Introduction. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1218:1-7.

199. Ho DM, Artavanis-Tsakonas S, Louvi A. The Notch pathway in CNS homeostasis and neurodegeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2020;9(1):e358.
200. Kozyrev I, Dokshin P, Kostina A, Kiselev A, Ignatieva E, Golovkin A, et al. Dysregulation of Notch signaling in cardiac mesenchymal cells of patients with tetralogy of Fallot. *Pediatr Res.* 2020;88(1):38-47.
201. Chung E, Deacon P, Park JS. Notch is required for the formation of all nephron segments and primes nephron progenitors for differentiation. *Development.* 2017;144(24):4530-9.
202. Ma T, Li X, Zhu Y, Yu S, Liu T, Zhang X, et al. Excessive Activation of Notch Signaling in Macrophages Promote Kidney Inflammation, Fibrosis, and Necroptosis. *Front Immunol.* 2022;13:835879.
203. Sweetwyne MT, Gruenwald A, Niranjana T, Nishinakamura R, Strobl LJ, Susztak K. Notch1 and Notch2 in Podocytes Play Differential Roles During Diabetic Nephropathy Development. *Diabetes.* 2015;64(12):4099-111.
204. Tian H, Yang J, Xie Z, Liu J. Gliquidone Alleviates Diabetic Nephropathy by Inhibiting Notch/Snail Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(5):2085-97.
205. Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Mehdorn HM. The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. *Neurol Res.* 2010;32(8):816-20.
206. Leonova E, Sokolovska J, Boucher JL, Isajevs S, Rostoka E, Baumane L, et al. New 1,4-Dihydropyridines Down-regulate Nitric Oxide in Animals with Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus and Protect Deoxyribonucleic Acid against Peroxynitrite Action. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;119(1):19-31.
207. Shi Y, Wang P, Guo Y, Liang X, Li Y, Ding S. Helicobacter pylori-Induced DNA Damage Is a Potential Driver for Human Gastric Cancer AGS Cells. *DNA Cell Biol.* 2019;38(3):272-80.
208. Khan S, Raghuram GV, Bhargava A, Pathak N, Chandra DH, Jain SK, et al. Role and clinical significance of lymphocyte mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Transl Res.* 2011;158(6):344-59.
209. Economopoulou M, Langer HF, Celeste A, Orlova VV, Choi EY, Ma M, et al. Histone H2AX is integral to hypoxia-driven neovascularization. *Nat Med.* 2009;15(5):553-8.
210. Garcia-Tello A, Ramon de Fata F, Andres G, Ropero S, Lopez JI, Angulo JC. DNA repair genes and prognosis in sporadic forms of urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Actas Urol Esp.* 2014;38(9):600-7.

211. Zhao L, Wang X, Sun L, Nie H, Liu X, Chen Z, et al. Critical role of serum response factor in podocyte epithelial-mesenchymal transition of diabetic nephropathy. *Diab Vasc Dis Res*. 2016;13(1):81-92.
212. Gagliardini E, Perico N, Rizzo P, Buelli S, Longaretti L, Perico L, et al. Angiotensin II contributes to diabetic renal dysfunction in rodents and humans via Notch1/Snail pathway. *Am J Pathol*. 2013;183(1):119-30.
213. Fang KY, Lou JL, Xiao Y, Shi MJ, Gui HZ, Guo B, et al. [Transforming growth factor-beta1 and Snail1 mediate tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic rats]. *Sheng Li Xue Bao*. 2008;60(1):125-34.
214. Yang G, Zhao Z, Zhang X, Wu A, Huang Y, Miao Y, et al. Effect of berberine on the renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition by inhibition of the Notch/snail pathway in diabetic nephropathy model KKAY mice. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1065-79.
215. Liu F, Zhang S, Xu R, Gao S, Yin J. Melatonin Attenuates Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Glomerular Endothelial Cells via Regulating miR-497/ROCK in Diabetic Nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(5):1425-36.
216. Boyle SC, Kim M, Valerius MT, McMahon AP, Kopan R. Notch pathway activation can replace the requirement for Wnt4 and Wnt9b in mesenchymal-to-epithelial transition of nephron stem cells. *Development*. 2011;138(19):4245-54.
217. DiRocco DP, Kobayashi A, Taketo MM, McMahon AP, Humphreys BD. Wnt4/beta-catenin signaling in medullary kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(9):1399-412.
218. He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):765-76.
219. Ren X, Zhu R, Liu G, Xue F, Wang Y, Xu J, et al. Effect of sitagliptin on tubulointerstitial Wnt/beta-catenin signalling in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2019;24(11):1189-97.
220. Wang W, Zhang J, Wang X, Wang H, Ren Q, Li Y. Effects of melatonin on diabetic nephropathy rats via Wnt/beta-catenin signaling pathway and TGF-beta-Smad signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(5):2488-96.
221. Xiang X, Cai HD, Su SL, Dai XX, Zhu Y, Guo JM, et al. *Salvia miltiorrhiza* protects against diabetic nephropathy through metabolome regulation and wnt/beta-catenin and TGF-beta signaling inhibition. *Pharmacol Res*. 2019;139:26-40.
222. Chen C, Shi Y, Ma J, Chen Z, Zhang M, Zhao Y. Trigonelline reverses high glucose-induced proliferation, fibrosis of mesangial cells via modulation of Wnt signaling pathway. *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):28.

223. Lin CL, Cheng H, Tung CW, Huang WJ, Chang PJ, Yang JT, et al. Simvastatin reverses high glucose-induced apoptosis of mesangial cells via modulation of Wnt signaling pathway. *Am J Nephrol.* 2008;28(2):290-7.
224. Zhu D, Yu H, He H, Ding J, Tang J, Cao D, et al. Spironolactone inhibits apoptosis in rat mesangial cells under hyperglycaemic conditions via the Wnt signalling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2013;380(1-2):185-93.
225. Dai C, Stolz DB, Kiss LP, Monga SP, Holzman LB, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(9):1997-2008.
226. Kato H, Gruenwald A, Suh JH, Miner JH, Barisoni-Thomas L, Taketo MM, et al. Wnt/beta-catenin pathway in podocytes integrates cell adhesion, differentiation, and survival. *J Biol Chem.* 2011;286(29):26003-15.
227. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(4):450-7.
228. Sharma S, Sirin Y, Susztak K. The story of Notch and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(1):56-61.
229. Zhang H, Xing J, Zhao L. Lysine-specific demethylase 1 induced epithelial-mesenchymal transition and promoted renal fibrosis through Jagged-1/Notch signaling pathway. *Hum Exp Toxicol.* 2021;40(12_suppl):S203-S14.
230. Jiang L, Liu X, Hu X, Gao L, Zeng H, Wang X, et al. METTL3-mediated m(6)A modification of TIMP2 mRNA promotes podocyte injury in diabetic nephropathy. *Mol Ther.* 2022;30(4):1721-40.
231. Al-Awaida WJ, Hameed WS, Al Hassany HJ, Al-Dabet MM, Al-Bawareed O, Hadi NR. Evaluation of the Genetic Association and Expressions of Notch-2 /Jagged-1 in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Med Arch.* 2021;75(2):101-8.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Matea Dragun Jurić

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 06. svibnja 1992. godine, Split, Republika Hrvatska

E-MAIL ADRESA: matea.dragun5@gmail.com

OBRAZOVANJE

1998. - 2006. Osnovna škola "Pujanki", Split

2006. - 2010. IV. Gimnazija "Marko Marulić", Split

2010. - 15.07.2016. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine (težinski prosjek ocjena na kraju studija: 4,883; opći prosjek ocjena na kraju studija: 4,91)

2016./2017. → Poslijediplomski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; Akademске godine 2020./2021. upisana treća godina poslijediplomskog studija

ZNANJA I VJEŠTINE

Vozač B kategorije

Aktivno služenje engleskim jezikom

Poznavanje talijanskog jezika

NAGRADE

2010. - 2016. Stipendija Nacionalne zaklade za potporu učeničkom i studentskom standardu

2015. Dekanova nagrada za akademsku godinu 2013./2014.

2016. Rektorova nagrada za izvrsnost za akademsku godinu 2014./2015.

2017. Dekanova pohvalnica za izvrstan uspjeh tijekom studija

2017. Rektorova nagrada za organizaciju projekta "Natjecanje u kliničkim vještinama" s ciljem integracije studenata medicine i farmacije u kliničkoj praksi

RADNO ISKUSTVO

04.11.2016. - 04.04.2017. - Pripravnički staž (Klinički bolnički centar Split)

12.06.2017. - 31.08.2017. - Zavod za hitnu medicinu Šibensko-kninske županije, Ispostava Skradin

01.09.2017. - 31.05.2018. - Dom Zdravlja Šibenik, Ambulanta Zlarin, Prvić, Žirje, Kaprije

01.06.2018. ---> Specijalističko usavršavanje iz opće interne medicine, Zavod za hitnu i intenzivnu medicinu s kliničkom farmakologijom i toksikologijom, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Split

ZNANSTVENA AKTIVNOST

2021. Dragun, M.; Filipovic, N.; Racetin, A.; Kostic, S.; Vukojevic, K. Immunohistochemical Expression Pattern of Mismatch Repair Genes in the Short-term Streptozotocin-induced Diabetic Rat Kidneys. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* **2021**, 29, e83-e91, doi:10.1097/PAI.0000000000000937.

2022. Dragun Jurić, M.; Racetin, A.; Filipovic, N.; Kelam, N.; Kostic, S.; Ljutic, D.; Vukojevic, K. Altered Expression of EMT-Related Factors Snail, Wnt4, and Notch2 in the Short-term Streptozotocin-induced Diabetic Rat Kidneys. *Life* **2022**, 12, doi: 10.3390/life12101486.

OSTALE AKTIVNOSTI

2012.-2016. - članica Međunarodne udruge studenata medicine IFMSA Croatia i aktivna članica studentske udruge studenata medicine CroMSIC Split

2012.-2016. – sudjelovanje u tečajevima organiziranim u studentskoj udruzi CroMSIC kao što su tečajevi kirurškog šivanja, tečaj obrade rane, tečaj BLS-a (Basic Life Support) i tečaj ALS-a (Advanced Life Support)

Akadska godina 2014./2015. i 2015./2016. - demonstratorica na Katedri za anatomiju studentima medicine, stomatologije i medicine na engleskom jeziku

01.08.-31.08.2014. - profesionalna IFMSA razmjena studenata, odsjek Anesteziologije i intenzivne skrbi, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Češka Republika

2015. godina - sudjelovanje u tečaju trajne edukacije "Hitna stanja u ORL" u Splitu te kongresu "Budućnost zdravstvene industrije" u Zagrebu

16.05.-20.05.2016. - klinička praksa na odjelu Ginekologije i opstetricije Opće bolnice Šibenik

2016. godina - sudjelovanje u organizaciji i realizaciji projekta "Natjecanje u kliničkim vještinama" održanog 04. i 05. lipnja 2016. godine u Splitu kao član Povjerenstva

01.09. - 30.09.2016. - profesionalna IFMSA razmjena studenata, odsjek Opće interne medicine, hospital San Rafael, Cadiz, Španjolska

2017. godina - sudjelovanje u realizaciji projekta Praktična znanja za studente održanog od 06.04. do 08.04.2017.

24.09. – 21.12.2018. - pohađanje tečaja Ultrazvuk u kliničkoj praksi "Ultrasonografska dijagnostika abdomena" – samostalno obavljanje djelatnosti iz područja ultrazvučne dijagnostike trbušnih organa

01.02. - 02.02.2019. - sudjelovanje na simpoziju "HT - Cardio course", European Society of Hypertension, Bled, Slovenia

15.03. - 16.03.2019. - pohađanje tečaja "Monitoring Solution in critical areas clinical course", Hotel Trakošćan

26.03. - 27.03.2019. - pohađanje tečaja USLS-B1 Ultrasound life support course (Ultrasound in primary, emergency & critical care medicine), Hotel Rebro, Zagreb

14.04. - 15.04.2019. - sudjelovanje na simpoziju "Sandoz Akademija", Hotel Pinija, Petrčane, Zadar

11.06. – 13.06.2019. – sudjelovanje na simpoziju “Master of Antimicrobial Therapy in Clinical practice in Hospital (MATCH)”, Infectious Diseases Clinic, University of Udine, Italija