

# Izražaj sigma 1 receptora u bubrezima dijabetičnih štakora

---

**Milardović, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:884113>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-20**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**I**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Milardović**

**IZRAŽAJ SIGMA 1 RECEPTORA U BUBREZIMA DIJABETIČNIH ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Natalija Filipović**

**Split, veljača 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**I**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Milardović**

**IZRAŽAJ SIGMA 1 RECEPTORA U BUBREZIMA DIJABETIČNIH ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2018./2019.**

**Mentor: doc. dr. sc. Natalija Filipović**

**Split, veljača 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Anatomija i histologija čovjeka  
**Tema rada** je prihvaćena na \_\_\_sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na \_\_\_sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i \_\_\_sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc. dr. sc. Natalija Filipović, dr. med. vet.  
**Pomoć pri izradi:**

### IZRAŽAJ SIGMA 1 RECEPTORA U BUBREZIMA DIJABETIČNIH ŠTAKORA

Ivana Milardović, 97

**Sažetak:** Sigma receptori su izvorno otkriveni u živčanom sustavu, ali ih nalazimo i u različitim drugim tkivima, uključujući bubreg. Dosadašnja istraživanja ukazuju na renoprotektivno djelovanje  $\sigma 1R$  koje je većinom posredovano modulacijom signalnog puta dušikovog oksida. S obzirom na važnost ovog signalnog puta u patogenezi dijabetičke nefropatije za pretpostaviti je da i  $\sigma 1R$  imaju važnu ulogu u patogenezi ovoga stanja. Svrha istraživanja je bila utvrditi promjene izražaja  $\sigma 1R$  u bubrezima, koje bi posredno ukazivale na njihovu eventualnu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije. Istraživanje je provedeno na Sprague Dawley štakorima. Model šećerne bolesti tipa 1 izazvan je injekcijom streptozotocina (55 mg/kg). U pokus su uključeni štakori kojima je 4. dan nakon indukcije šećerne bolesti izmjerena koncentracija glukoze u krvi  $>16.5$  mmol/L. Nakon 2 tjedna odnosno 2 mjeseca životinje su eutanazirane te je uzet uzorak tkiva bubrega. Tkivo je pripremljeno te su napravljeni parafinski rezovi, te obojeni imunofluorescencijski i histološkom tehnikom PAS. Obojeni rezovi fotografirani su te su dobivene mikrofotografije analizirane korištenjem ImageJ. Za statističku analizu korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Tukey-ev test za višestruke usporedbe. Kod dijabetične skupine štakora 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a vidljive su patološke promjene u bubregu. Te promjene su: ekspanzija mezangija, tubularna skleroza, nakupljanje hijalinog materijala u stijenkama krvnih žila i vakuolizacije stanica distalnih tubula. Analiziran je broj  $\sigma 1R$  imunoreaktivnih distalnih tubula i uočeno da u kontrolnim skupinama broj pozitivnih distalnih tubula opada s vremenom, dok u dijabetičnim skupinama raste (oba  $P<0,001$ ). Broj pozitivnih tubula bio je značajno niži u dijabetičnoj skupini 2 tjedna nakon injekcije STZ-a u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $P<0,01$ ); dok je broj  $\sigma 1R$  pozitivnih tubula bio statistički značajno veći u dijabetičnoj skupini 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $P<0,001$ ). Površina  $\sigma 1R$  imunoreaktivnosti bila je statistički značajno veća u dijabetičnoj skupini 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali i u usporedbi s dijabetičnom skupinom 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti (oba  $P<0,01$ ). U vakuoliziranim stanicama distalnih tubula dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a uočena je kolokalizaciju  $\sigma 1R$  i upalnog čimbenika rasta TGF $\beta$ . Našim istraživanjem utvrdili smo najjači izražaj  $\sigma 1R$  u stanicama distalnih tubula bubrega štakora. Dinamika izražaja ovih receptora posredno ukazuje na njihovu ulogu u postnatalnom sazrijevanju bubrega štakora te u razvoju dijabetičke nefropatije, posebice oštećenja distalnih tubula.

**Ključne riječi:** šećerna bolest tipa 1, sigma 1 receptor, bubreg, dijabetička nefropatija

**Rad sadrži:** 38 stranica, 3 slike, 28 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević - predsjednik
2. prof. dr. sc. Mirna Saraga-Babić - član
3. doc. dr. sc. Natalija Filipović, dr.med. vet. – član - mentor

**Datum obrane:** 15. veljače 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Splitu, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Human Anatomy and Histology  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. \_\_\_ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. \_\_\_ and Faculty Council of School of Medicine, session no. \_\_\_  
**Mentor:** Assistant professor Natalija Filipović, PhD, DVM  
**Technical assistance:**

### EXPRESSION OF SIGMA 1 RECEPTORS IN DIABETIC RATS

Ivana Milardović, 97

**Summary:** Sigma receptors are originally detected in the nervous system, but they are also found in various other tissues, including the kidney. Previous studies indicate the renoprotective activity of  $\sigma$ 1R, which is mostly mediated by modulation of the nitric oxide signaling pathway. Considering the importance of this signaling pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy, it could be assumed that  $\sigma$ 1R have an important role in the pathogenesis of this condition. The purpose of the study was to investigate changes in the expression of  $\sigma$ 1R in the kidneys, which could indicate their possible role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The research was carried out on Sprague Dawley rats. The type 1 diabetes mellitus was induced by the injection of streptozotocin (55 mg/kg). Rats with blood glucose level  $>16.5$  mmol/L on the 4th day following the induction of diabetes were included in the experiment. The animals were sacrificed 2 weeks or 2 months after diabetes induction and a kidney tissue sample was harvested. The tissue was embedded in paraffin and 5  $\mu$ m thick section were made, and stained with histological technique PAS and immunofluorescence method. Stained sections were photographed, and the resulting images were analyzed using ImageJ. For statistical analysis, a one-way variance analysis (ANOVA) and a Tukey test for multiple comparisons were used. In the kidney of the diabetic group of rats 2 months after injection of STZ, pathological changes characteristic for diabetes nephropathy were apparent, including: the expansion of mesangium, tubular sclerosis, the accumulation of hyaline material in the walls of the blood vessels and the vacuolization of distal tubule cells. The number of  $\sigma$ 1R immunoreactive distal tubules in the control groups decreased with time, while in diabetic groups it increased (both  $P<0.001$ ). The number of immunoreactive tubules was significantly lower in the diabetic group 2 weeks after STZ injection when compared to the corresponding control group ( $P<0.01$ ); while the number of  $\sigma$ 1R positive tubules was significantly higher in the diabetic group 2 months after the induction of diabetes in comparison to the corresponding control group ( $P<0.001$ ). The area of  $\sigma$ 1R immunoreactivity was significantly higher in the diabetic group 2 months after the induction of diabetes compared to the control group, but also in comparison with the diabetic group 2 weeks after the induction of diabetes (both  $P<0.01$ ). In vacuolated distal tubule cells of diabetic rats 2 months after injection of STZ, colocalization of  $\sigma$ 1R and inflammatory growth factor TGF $\beta$  was observed. Our research has shown the strongest expression  $\sigma$ 1R in the distal tubules in kidney of the rats. The dynamics of the expression of these receptors indicate their role in postnatal etiology of kidney maturation and in the development of diabetic nephropathy, in particular in the damage of distal tubules.

**Key words:** diabetes mellitus type 1, sigma 1 receptor, kidney, diabetic nephropathy

**Thesis contains:** 38 pages, 3 figures, 28 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Katarina Vukojević, PhD, DM, associate professor - chair person
2. Mirna Saraga-Babić, PhD, MD, professor - member
3. Natalija Filipović, PhD, DVM, assistant professor - supervisor

**Defence date:** February 15, 2019

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Šećerna bolest tipa 1 .....	4
1.2. Šećerna bolest tipa 2 .....	4
1.3. Gestacijski dijabetes .....	5
1.4. Komplikacije šećerne bolesti .....	5
1.5. Dijabetička nefropatija.....	6
1.6. Sigma 1 receptori.....	8
1.7. Uloga sigma 1 receptora u bubregu .....	9
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	13
3.1. Eksperimentalne životinje.....	14
3.2. Model šećerne bolesti u štakora .....	14
3.3. Priprema tkiva za bojanja.....	14
3.4. Imunofluorescencijsko bojanje .....	14
<b>4. REZULTATI</b> .....	16
4.1. Periodic acid-Schiff (PAS) histološko bojanje rezova bubrega štakora u modelu šećerne bolesti tipa 1 .....	17
4.2. Broj sigma 1 imunoreaktivnih distalnih tubula u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini .....	17
4.3. Površina sigma 1 imunoreaktivnosti u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini.....	17
4.4. Kolokalizacija sigma 1 receptora i čimbenika rasta i transformacije $\beta$ (TGF $\beta$ ) u bubregu dijabetičnih štakora .....	18
<b>5. RASPRAVA</b> .....	22
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	25
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	27
<b>8. SAŽETAK</b> .....	31
<b>9. SUMMARY</b> .....	34
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	37



*Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Filipović na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, strpljenju, pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojim prijateljima na podršci i ohrabrivanju u teškim trenucima, na pomoći kada mi je to bilo potrebno, na svim skuhanim kavama i prije svega na mnogim lijepim uspomena stvorenim tijekom studentskih dana koje ću pamtiti čitav život.*

*Hvala svim dragim ljudima koje sam upoznala tijekom studentskih dana i koji su me upotpunili, proširili vidike i obogatili novim znanjima, vještinama i iskustvima.*

*Posebno hvala mojoj obitelji koja je uvijek bili uz mene i podržavala me u svim mojim odlukama.*



## **1. UVOD**

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) je kronična bolest uzrokovana naslijeđenim ili stečenim nedostatkom u proizvodnji inzulina iz  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače, smanjenom osjetljivošću tkiva na proizvedeni inzulin ili oboje. Nemogućnost proizvodnje inzulina ili neučinkovita primjena inzulina dovodi do porasta razine glukoze u krvi, odnosno do hiperglikemije (1,2,3).

Najčešći simptomi šećerne bolesti su učestalo mokrenje, pojačana žeđ ili glad, mutan vid, umor i gubitak težine. Kod oboljele osobe se ne moraju javljati svi simptomi, niti se simptomi moraju javljati kod svakog bolesnika. Brzo prepoznavanje simptoma, dijagnoza i liječenje može smanjiti razvoj komplikacija šećerne bolesti (4).

Šećerna bolest predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih problema suvremenog društva. Razlog tome je promjena životnih navika suvremenih ljudi koje uključuju smanjenu tjelesnu aktivnost, konzumiranje visokokalorične hrane što dovodi do porasta broja pretilih osoba. Procjenjuje se da trenutno u svijetu 415 milijuna ljudi u dobi od 20 do 79 godina živi sa šećernom bolešću, a polovica nema postavljenu dijagnozu, te ne prima liječenje (5). Očekuje se da će broj oboljelih tijekom godina rasti i to osobito u zemljama u razvoju kao posljedica rasta broja stanovništva, starenja, sjedilačkog načina života i prehrane. Do 2025. većina ljudi sa šećernom bolesti u razvijenim zemljama imat će 65 godina ili više, a u zemljama u razvoju većina oboljelih će biti u dobnoj skupini od 45 do 64 godine tj. u radno sposobnim godinama. Oko 5 milijuna osoba u svijetu godišnje umre zbog posljedica šećerne bolesti (1). Prema podacima iz Crodiabb registra iz 2015. godine 260 092 osoba u dobi od 20 do 79 godine u Hrvatskoj bolovalo je od šećerne bolesti, što bi značilo da je prevalencija šećerne bolesti u Hrvatskoj tada iznosila 8,34%. Taj postotak ima tendenciju rasta tijekom godina. U Republici Hrvatskoj šećerna bolest se nalazi među 10 vodećih uzroka smrti (5).

Na svjetskoj razini, preko 670 milijardi dolara godišnje iznose troškovi zdravstvene zaštite vezane uz šećernu bolest. U Hrvatskoj 11,5% proračuna Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (HZZO), odnosno 2,5 milijardi kuna godišnje odlazi za pokrivanje troškova liječenja šećerne bolesti ili njezinih posljedica. Od ovog iznosa 86% čine troškovi liječenja komplikacija šećerne bolesti – retinopatije, nefropatije i kardiomiopatije (5). Na sjednici Vlade Republike Hrvatske održanoj 24. lipnja 2015. godine usvojen je Nacionalni program zdravstvene zaštite osoba sa šećernom bolesti 2015.-2020. Svrha toga programa je povećati broj dijagnoza u ranoj fazi bolesti, smanjiti broj komplikacija šećerne bolesti i

adekvatno pratiti ishod trudnoća kod pacijentica koje imaju dijagnosticiranu šećernu bolest (6,7).

Šećerna bolest se dijagnosticira na nekoliko načina:

- kada osoba ima izmjerenu glukozu natašte  $\geq 7,0$  mmol/L
- kada je razina glukoze u krvi 2 sata nakon uzimanja 75 grama glukoze oralno (OGTT)  $\geq 11,1$  mmol/L
- kada je razina glukoze u krvi  $\geq 11,1$  mmol/L izmjerena neovisno o jelu kod osoba koji imaju tipične simptome šećerne bolesti
- kada je Hemoglobin A1c (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ .

Preporučuje se mjerenja ponoviti najmanje 2 puta kako bi se potvrdila dijagnoza (8).

Liječenje šećerne bolesti ovisi o tipu bolesti. Šećerna bolest tipa 1 liječi se isključivo inzulinom, dok kod tipa 2 liječiti se može nefarmakološkim i farmakološkim mjerama. Nefarmakološke mjere uključuju tjelovježbu i primjerenu dijetu, dok farmakološke mjere uključuju oralne hipoglikemike i inzulin. Oralni hipoglikemici uključuju više skupina lijekova: derivate sulfonilureje, kratkodjelujuće sekretagoge, bigvanide, tiazolidindione, inhibitore glukozidaze i antagoniste glukagon sličnog peptida (GLP, eng. Glucagon-like peptide) (9). Basic Information Sheet (BIS) prijave prikupljene 2015. godine za 34 070 osoba pokazuju sljedeće podatke: većina bolesnika za liječenje šećerne bolesti koristila je oralne hipoglikemike njih 76%, 13% je koristilo kombinaciju oralnih hipoglikemika i inzulina, 11% ih se liječilo isključivo inzulinom, a manje od 1% nefarmakološkim mjerama. Kod tih pacijenata izmjereni HbA1c je bio manji od 6,5% u 26,78% slučajeva, između 6,5% i 7,5% u 33,26% slučajeva i veći od 7,5% u 39,96% slučajeva. Iz tih podataka možemo zaključiti da je više od trećine bolesnika imalo lošu regulaciju glikemije. Prosječne vrijednosti bile su (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) HbA1c 7,46%  $\pm$  1,51, glikemije natašte 8,61 mmol/L  $\pm$  3,02 te postprandijalne glikemije 9,37 mmol/L  $\pm$  3,35 (10).

Šećernu bolest možemo klasificirati u 4 skupine:

1. Šećerna bolest tipa 1
2. Šećerna bolest tipa 2
3. Drugi tipovi šećerne bolesti uzrokovani endokrinopatijama, pankreatitisom, lijekovima i ostalo
4. Gestacijski dijabetes (8).

## 1.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 poznata i kao dijabetes ovisan o inzulinu obuhvaća oko 5% oboljelih. Možemo je podijeliti u dvije podgrupe: autoimunu i idiopatsku. Kod autoimune šećerne bolesti imunološki sustav napada  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića zbog čega gušterača tih osoba ne proizvodi dovoljno inzulina. Smatra se da je nastanak autoimunog tipa rezultat interakcije genske predispozicije za razvitak šećerne bolesti, autoantigena i raznih okolišnih čimbenika, međutim ta interakcija još nije dovoljno razjašnjena. Neki od gena koji se povezuju su geni glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC, engl. Major Histocompatibility Complex) i to ljudski leukocitni antigen-DR3 (HLA-DR3, engl. Human Leukocyte Antigen-DR3), HLA-DQB1\*0201 i HLA-DR4, HLA-DQB1\*0302. Oni su pronađeni u više od 90% oboljelih, kao i neki geni koji ne pripadaju tom kompleksu, a uključeni su u proizvodnju i promet inzulina. U autoantigene se ubrajaju dekarboksilaza glutaminske kiseline, inzulin, protein vezan uz inzulinom i druge bjelančevine  $\beta$ -stanica. Te bjelančevine se mogu oslobađati u normalnom procesu ili zbog oštećenja  $\beta$ -stanica što posljedično aktivira autoimuni odgovor. Kod idiopatskog tipa nema dokaza o autoimunosti (9).

Ovaj tip pogađa uglavnom osobe mlađe životne dobi, iako se može razviti kod svih ljudi neovisno o dobi. Kod osoba s ovim oblikom dijabetesa nužno je primanje injekcije inzulina svaki dan kako bi kontrolirali razinu glukoze u krvi i kako bi spriječili nastanak dijabetičke ketoacidoze (DKA). Ketoacidoza je akutna metabolička komplikacija šećerne bolesti. Stanice radi manjka inzulina ne dobivaju dovoljnu količinu glukoze da zadovolji potrebu tijela za energijom. Zbog toga tijelo počne razgrađivati masti, čijom se razgradnjom u uvjetima nedostatka glukoze proizvode ketonska tijela. Iz ketona nastaju ketokiseline koje su toksične za organizam. Dijabetička ketoacidoza može dovesti do kome pa i do smrtnog ishoda (9,11).

## 1.2. Šećerna bolest tipa 2

Šećerna bolest tipa 2, dijabetes neovisan o inzulinu, obuhvaća najmanje 90% svih slučajeva bolesti. Kod ovog tipa se pojavljuje inzulinska rezistencija, periferna tkiva postaju neosjetljiva na proizvedeni inzulin. Zbog toga gušterača u početku proizvodi dodatni inzulin, ali tijekom vremena ne može više proizvoditi dovoljno inzulina kako bi održala normalnu razinu glukoze u krvi. Tijekom vremena proizvodnja inzulina kreće opadati što dodatno

pogoršava hiperglikemiju. Ovaj tip bolesti se može pojaviti u bilo kojoj dobi, a često je povezan s vanjskim čimbenicima kao što su prekomjerna težina, nepravilna prehrana, nedostatna tjelovježba. Pronađeni su i dokazi da je genetika odgovorna za povećani rizik za razvitak šećerne bolesti tipa 2, no za razliku od šećerne bolesti tipa 1 to nije povezano s genima HLA regije. Neke osobe s ovim tipom bolesti mogu održavati normalnu razinu glukoze s pravilnom prehranom i tjelovježbom, međutim uglavnom se koriste razne vrste oralnih hipoglikemika, najčešće metformin, koji se po potrebi mogu kombinirati međusobno ili s inzulinom (9,12).

### **1.3. Gestacijski dijabetes**

Kod trudnica kod kojih nije dijagnosticirana šećerna bolest prije trudnoće, a kojima su za vrijeme trudnoće izmjerene visoke razine glukoze u krvi kažemo kako boluju od gestacijskog dijabetesa. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti iz 2014. godine prevalencija gestacijskog dijabetesa iznosila je 9,2%. Kod ovoga tipa bolesti tijelo žene ne može proizvesti i iskoristiti dovoljnu količinu inzulina koje je potrebno tijelu u trudnoći. Zbog toga se glukoza nakuplja u krvi u visokim razinama (13,14).

### **1.4. Komplikacije šećerne bolesti**

Kronična hiperglikemija može dovesti do brojnih komplikacija i oštećenja gotovo svih tkiva i organa u tijelu oboljele osobe. U većini država s visokim dohotkom šećerna bolest je vodeći uzrok kardiovaskularnih bolesti, sljepoće, zatajenja bubrega i amputacije donjih ekstremiteta. Uz to osobe oboljele od šećerne bolesti imaju veći rizik od razvoja raznih infekcija. Komplikacije možemo podijeliti u dvije skupine: mikrovaskularne i makrovaskularne komplikacije (3,15).

U mikrovaskularne komplikacije ubrajamo retinopatiju, nefropatiju i neuropatiju. One nastaju u stanicama i tkivima koja ne mogu ograničiti transport glukoze za vrijeme hiperglikemije. Razvitak mikrovaskularnih komplikacija ovisi o jačini i trajanju hiperglikemije (16).

Dijabetička retinopatija najčešća je mikrovaskularna komplikacija šećerne bolesti. Najčešće zahvaća retinu, no može zahvatiti i druge strukture. Dolazi do retinalne ishemije i proliferativne retinopatije. Također može nastati makularni edem i makulopatija koji su glavni uzroci gubitka vida. Uglavnom se pojavljuje unutar 20 godina od dijagnoze kod

šećerne bolesti tipa 1, dok kod šećerne bolesti tipa 2 rani simptomi retinopatije se mogu pojaviti i godinama prije postavljene dijagnoze (8,16)

Dijabetička neuropatija je skup heterogenih poremećaja. Dolazi do oštećenja krvnih žila koje opskrbljuju periferne živce što rezultira njihovom ishemijom. Najčešća neuropatija je kronična senzomotorička distalna simetrična polineuropatija. Pacijenti mogu osjećati žarenje, trnjenje, bol i ukočenost. Posljedica neuropatije može biti i nastanak ulceracija na stopalu i u konačnici amputacija (16).

U makrovaskularne komplikacije ubrajamo koronarnu arterijsku bolest, perifernu arterijsku bolest i cerebrovaskularne komplikacije. Pacijenti koji boluju od šećerne bolesti imaju 5 puta veću šansu za razvitak kardiovaskularnih bolesti. Temeljni patofiziološki mehanizam nastanka makrovaskularnih komplikacija je ateroskleroza. Ateroskleroza nastaje kao posljedica kronične upale te ozljede stijenke perifernih ili koronarnih arterija. U osoba sa šećernom bolešću više je čimbenika koji pogoduju nastanku i kasnijoj progresiji aterosklerotske bolesti kao što su hiperglikemija, hiperlipidemija, hipertenzija, hiperkoagulabilnost, pojačana adhezija trombocita, povišena razina plazminogen aktivirajućeg faktora 1 te smanjeno stvaranje dušikovog oksida (16,17).

### **1.5. Dijabetička nefropatija**

Dijabetička nefropatija je klinički sindrom karakteriziran sljedećim:

- Trajna albuminurija (>300 mg/dan ili >200 µg/min) koja se potvrđuje s najmanje 2 mjerenja u razmaku od 3 do 6 mjeseci
- Progresivni pad glomerularne filtracije (GF)
- Povišeni arterijski krvni tlak (18).

Dijagnoza se postavlja kad je utvrđena proteinurija u bolesnika sa šećernom bolešću u odsutnosti nekog drugog uzorka proteinurije kao što je naprimjer infekcija. Potvrđuje se mjerenjem albuminurije/proteinurije, mjerenjem glomerularne filtracije i mjerenjem krvnog tlaka (18,19). Poveznica između proteinurije i šećerne bolesti prepoznata je već krajem 18. stoljeća. Do 1950-ih, bolesti bubrega bile su poznata uobičajena komplikacija dijabetesa. Trenutno je dijabetička nefropatija vodeći uzrok kronične bolesti bubrega u zapadnim zemljama. Istraživanja su pokazala da 30-40% pacijenata u Sjedinjenim Američkim Državama su u terminalnoj fazi bolesti bubrega kao posljedica šećerne bolesti (18,20). Neki



od faktora povezani s razvojem dijabetičke nefropatije su: glikemija, trajanje bolesti, hipertenzija, hiperfiltracija, genetika i prehrana, osobito unos proteina. Bolest je karakterizirana zadebljanjem bazalne membrane glomerula, ekspanzijom mezangija i sklerozom glomerula. Ove promjene dovode do glomerularne hipertenzije i progresivnog pada glomerularne filtracije. Bolesnici s dijagnosticiranom sistemskom hipertenzijom imaju veće šanse za razvitak dijabetičke nefropatije kod oba tipa šećerne bolesti, jer hipertenzija ubrzava napredovanje ovih promjena. Bolest se najčešće manifestira kad se razvije nefrotski sindrom ili zatajenje bubrega (19).

Postoji 5 stadija dijabetičke nefropatije:

1. Hiperfunkcija bubrega, albuminurija je odsutna, GF povećana
2. Klinička latencija, albuminurija je odsutna, GF normalana
3. Mikroalbuminurija, albuminurija je prisutna (30–300 mg/dan), GF normalana
4. Jasna dijabetička nefropatija, albuminurija je prisutna (30–300 mg/dan), GF snižena
5. Kronično zatajenje bubrega, albuminurija je masivna (>300mg/dan), GF jako snižena (19).

Glomerularna filtracija je povećana u oba tipa šećerne bolesti. Kao posljedicu povišenog tlaka u glomerulu koji nastaje zbog vazodilatacije aferentne i vazokonstrikcije eferentne arteriole nastaje hiperfiltracija i hiperperfuzija. Kod dijabetičara je nefrin, protein koji je odgovoran za propustljivost glomerularne membrane, u manjku zbog čega se povećava propustljivost membrane. Nastala proteinurija može potaknuti ekspresiju upalnih molekula kao što je angiotenzinogen, koji se poslije pretvara u angiotenzin II. Posljedično se povećava ekspresija receptora za angiotenzin II zbog čega u dijabetičara u stanju hiperglikemije unatoč niskoj koncentraciji renina u plazmi, blokada sustava renin-angiotenzin uzrokuje značajni porast protoka plazme kroz bubrege. U dijabetičara je povećana aktivnost Na-kotransportera glukoze zbog čega se povećava reapsorpcija natrija u proksimalnom tubulu a kao posljedica dolazi do povećanja GF i hiperfiltracije. Također je potaknuta reapsorpcija Na u distalnim tubulima i aktiviranje natrijevog prolaza u sabirnim kanalima bubrega zbog visoke koncentracije angiotenzina II. Navedene promjene dovode do retencije natrija, zadržavanja tekućine, hipervolemije i porasta krvnog tlaka (19).

Kod pacijenata kod kojih je utvrđena dijabetička nefropatija izuzetno je bitna stroga kontrola glikemije. Dobra kontrola može smanjiti glomerularnu hiperfiltraciju i albuminuriju

te usporiti progresiju kronične bolesti bubrega. Također je važna kontrola krvnog tlaka. U liječenju su prvi izbor inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitor, eng. angiotensin-converting-enzyme inhibitor) i blokatori angiotenzinskih receptora (ARB, eng. Angiotensin receptor blockers) zbog toga što djeluju zaštitno na bubreg. Osim što snižavaju sistemski arterijski tlak, snižuju i glomerularni tlak zbog dilatacije eferentnih arteriola, smanjuju proteinuriju i poništavaju učinak angiotenzina II na sistemskoj i lokalnoj razini. Koristan učinak ovih lijekova može se očekivati u početnoj i srednje izraženoj dijabetičkoj nefropatiji, dok kod uznapredovane bolesti nije dokazana velika korisnost. Kod pacijenata s dijabetičkom nefropatijom preporučuje se ispravljanje anemije i dislipidemije, kako bi se smanjili simptomi bolesti, spriječile daljnje komplikacije i poboljšala kvaliteta života (19,20).

### 1.6. Sigma 1 receptori

Sigma receptori ( $\sigma R_i$ ) su relativno nova skupina receptora izvorno otkrivena u središnjem živčanom sustavu (SŽS) sisavaca 1976. godine (21).  $\sigma R_i$  su u početku identificirani kao podtipovi opijatnih receptora, međutim daljnja istraživanja odbacila su tu tvrdnju. Ovi receptori s prosječnim ili visokim afinitetom vežu širok spektar kemijskih spojeva vrlo različitih strukturnih klasa i različitih terapijskih i farmakoloških svojstava. Danas se smatra da  $\sigma R_s$  može posredovati imunosupresivne, antipsihotične i neuroprotektivne učinke mnogih lijekova. Sigma receptore dijelimo u dva podtipa sigma-1 ( $\sigma 1R$ ) i sigma-2 ( $\sigma 2R$ ) receptore. Predložen je i treći podtip receptora, no on još nije istražen i definiran na odgovarajući način. Podtipovi se razlikuju prema molekularnim težinama i različitoj selektivnosti prema lijekovima.  $\sigma 1R$  je za razliku od  $\sigma 2R$  uspješno kloniran i više je istražen.  $\sigma 1R$  je uspješno kloniran 1996. godine, nakon što je pročišćen iz jetre zamorčeta. Iz mozga štakora je kloniran 1998. godine. Receptori klonirani iz zamorčeta, ljudi, miševa i štakora pokazuju 90-95% sličnosti.  $\sigma 1R$  su pronađeni u SŽS-u, jetri, bubrezima, plućima, endokrinim, imunološkim i reproduktivnim tkivima.  $\sigma 1R$  je transmembranski protein od 29 kDa. Gen za  $\sigma 1R$  nalazi se na kromosomu 9p13 kod ljudi, dok se kod glodavaca se nalazi na 2. kromosomu. Endogeni ligand za ovaj receptor još nije sa sigurnošću određen, ali pretpostavlja se da bi to mogao biti dimetiltriptamin (DMT) (21,22).

Smatra se da  $\sigma 1R$  može modulirati niz neurotransmiterskih sustava, uključujući glutamatni, noradrenergične, serotoninske i dopaminergične, s naglaskom na glutamatni sustav. Provedeno je više neurokemijskih i elektrofizioloških studija kako bi se ustvrdila funkcija  $\sigma R_s$  (21). Na staničnoj razini djelovanje posredovano  $\sigma 1R$  može biti akutno i

kronično. Akutno djelovanje uključuje sigma-1 translokaciju receptora i modulaciju ionskih kanala kao što su  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{K}^{+}$  kanali, *N*-metil-D-aspartatni (NMDA) receptori, inositol 1,4,5-trifosfat ( $\text{IP}_3$ ) receptori. Kroničnim djelovanjem  $\sigma 1\text{R}$  smatra se autoregulacija samog  $\sigma 1\text{R}$ , čak i bez egzogenih liganda. U kronična djelovanja još spada poticanje stanične diferencijacije, rekonstitucija lipidnih mikrodomena (u kultiviranim stanicama) i bihevioralna senzibilizacija (23).

### 1.7. Uloga sigma 1 receptora u bubregu

Dosadašnja istraživanja, korištenjem imunohistokemije i Western blot-a pokazala su da su  $\sigma 1\text{R}$  najizraženiji u bubrežnom korteksu, ali da su prisutni i u meduli i papili. Receptori su bili najizraženiji u stanicama proksimalnog tubula, a ne postoje dokazi da se nalaze u glomerulima (24).

$\sigma 1\text{R}$  ima široki spektar liganda koje može vezati za sebe. Tako su dekstrometorfan, (+) pentazocin, imipramin, fluvoksamin, fluoksetin, dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEA-sulfat) dokazani agonisti  $\sigma 1\text{R}$  (23). Provedena su pretestiranja s fluvoksaminom, agonistom visokog afiniteta  $\sigma 1\text{R}$ , kod štakora koji boluju u renalne ishemične reperfuzijske ozljede (IRI). IRI je glavni uzrok gubitka presatka nakon transplantacije bubrega. Endotelna disfunkcija, gubitak peritubularnih kapilara i povećana reaktivnost na vazokonstriktorske agense su poznate značajke tubularnog oštećenja tijekom progresije IRI. Svi ovi procesi doprinose smanjenoj proizvodnji i smanjenoj reakciji na dušikov oksid (NO). Tretiranje štakora s DHEA ili s fluvoksaminom poboljšalo je preživljenje, funkciju, strukturu bubrega i upalni odgovor nakon renalne ishemijske reperfuzijske ozljede. U ljudskim proksimalnim tubularnim epitelnim stanicama stimulacija fluvoksaminom ili oksidacijskim stresom uzrokovala je translokaciju  $\sigma 1\text{R}$  iz endoplazmatskog retikuluma u citosol i jezgru. Stimulacija fluvoksamina u tim stanicama također je aktivirala proizvodnju dušikovog oksida. Slično tome, u postishemičnom bubregu štakora aktivacija  $\sigma 1\text{R}$  fluvoksaminom je potaknula signalni put sintaze Akt-dušikov oksid, što je rezultiralo proizvodnjom dušikovog oksida. Istodobno, istraživanja su pokazala brzu peritubularnu vazodilataciju nakon liječenja fluvoksaminom, a koja je blokirana antagonistom  $\sigma 1\text{R}$  ili različitim blokatorima sintaze dušikovog oksida. Time je dokazano da su u ovom modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede štakora, agonisti  $\sigma 1\text{R}$  poboljšali preživljavanje i funkciju bubrega aktivacijom signalizacije dušikovog oksida posredovanog Akt-om u bubregu. Ovo istraživanje je od velikog značaja jer pokazuje da aktivacija  $\sigma 1\text{R}$

može pružiti terapijsku mogućnost kod ovakvih stanja (24).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Dosadašnja istraživanja uloge sigma receptora u bubregu uglavnom su se fokusirala na istraživanje IRI pri čemu je utvrđeno da je njihov učinak većinom posredovan modulacijom signalnog puta NO. S obzirom na važnost ovog signalnog puta u patogenezi dijabetičke nefropatije za pretpostaviti je da i sigma receptori imaju važnu ulogu u patogenezi ovoga stanja. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti izražaj sigma 1 receptora u bubregu u štakorskom modelu šećerne bolesti tipa 1.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Eksperimentalne životinje**

U ovom istraživanju korišteni su mužjaci Sprague-Dawley štakora osigurani od strane sekcije za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu. U istraživanje je uključeno 22 štakora koji su težili oko 200 grama. Držani su u kontroliranim uvjetima gdje je temperatura bila  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ , a štakori su bili izloženi ciklusu svjetla i tame 12/12 sati.

### **3.2 Model šećerne bolesti u štakora**

Štakorima je dana intraperitonealna injekcija 55 mg/kg streptozotocina (STZ) koji je otopljen u citratnom puferu (pH 4.5) kako bi se inducirala šećerna bolest tipa I. Štakori koji su korišteni kao kontrola dobili su čisti citratni pufer na isti način. Pokusne životinje hranjene su uobičajenom laboratorijskom hranom ad libitum (4RF21GLP, Mucedola, Settimo Milanese, Italija). Glukometrom (OneTouch Vita instrument, LifeScan, High Wycombe, UK) smo 4. dan nakon injekcije izmjerili razinu glukoze kako bi procijenili indukciju šećerne bolesti. Štakori uključeni u pokus imali su koncentraciju glukoze  $>16.5$  mmol/L. Dijabetični štakori podijeljeni su u dvije skupine, s odgovarajućim kontrolnim skupinama, ovisno o tome koliko je vremena prošlo od injekcije STZ-a (2 tjedna ili 2 mjeseca).

### **3.3. Priprema tkiva za bojanja**

Životinje su anestetizirane izofluranom (Forane, Abbott Laboratories, Queenborough, UK) i perfundirane kroz uzlaznu aortu s fiziološkom otopinom, a zatim s Zambonijevim fiksativom. Dobiveni uzorci bubrega su dehidrirani etanolom i uklopljeni u parafin. Parafinske blokove smo zatim rezali mikrotomom (Leica RM2155, Pittsburgh, PA, SAD) u rezove debljine 5- $\mu\text{m}$ . Nakon toga rezovi su deparafinizirani u ksilenu, rehidrirani etanolom, isprani destiliranom vodom i zagrijavani u natrijevom citratnom puferu (pH 7) tijekom 12 minuta. Na kraju postupka rezovi su ohlađeni do sobne temperature.

### **3.4. Imunofluorescencijsko bojanje**

Nakon hlađenja rezovi su inkubirani s primarnim antitijelima i ostavljeni u vlažnoj komori preko noći. Kao primarno protutijelo korišten je kozji anti-sigma 1 receptor (S18) (sc-22,948; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) razrijeđen 1:75. Rezovi su prvo isprani s PBS-om, a zatim je na njih primijenjeno sekundarno antitijelo. Kao sekundarno



protutijelo korišten je magareći anti-kozji igG-konjugiran s fluoroforom Alexa Fluor (AF) 488 (ab150129, Abcam, Cambridge, Velika Britanija) razrijeđen 1:400. Nakon jednog sata inkubacije rezovi su ponovno isprani s PBS-om i jezgre su obojene s 4'6-diamidin-2'-fenilindol dihidrokloridom (DAPI). Rezovi su pregledani pomoću mikroskopa BX51 (Olympus, Tokio, Japan), pri povećanju objektiva 10 puta i fotografirani digitalnim fotoaparatom DP71 (Olympus, Tokio, Japan). Snimljeno je 10 slika nepreklapajućih polja i obrađeno u ImageJ softveru (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Imunoreaktivni proksimalni tubuli su izbrojani i njihov broj je izražen po površini analiziranog područja. Nakon toga, također je izmjeren postotak  $\sigma$ 1R imunoreaktivne površine reza, korištenjem ImageJ, na 8-bitnim mikrofotografijama (metoda trokutastog praga). Podaci su uspoređeni između kontrolnih i dijabetičnih skupina, kao i različitih uzrasta unutar iste skupine.

Za određivanje statističkih razlika između više skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), nakon čega je slijedio Tukey-ev test za višestruke usporedbe (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Statistička značajnost je postavljena na  $P < 0,05$ .

#### **4. REZULTATI**

#### **4.1. Periodic acid-Schiff (PAS) histološko bojanje rezova bubrega štakora u modelu šećerne bolesti tipa 1**

Reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega štakora obojene PAS-tehnikom prikazane su na Slici 1. U bubrezima štakora 2 tjedna nakon početka pokusa (stari 10 tjedana) vide se još potpuno nerazvijeni tubuli sa širokim lumenom (Slika 1A i B), dok su tubuli u bubrezima štakora 2 mjeseca nakon početka pokusa (u dobi od 4 mjeseca) potpuno razvijeni (Slika 1C i D). U rezovima bubrega štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti (dm1-2m; Slika 1D) uočljive su patološke promjene karakteristične za šećernu bolest u vidu ekspanzije mezangija, tubularne skleroze, nakupljanja hijalinog materijala u stijenkama krvnih žila i vakuolizacije stanica distalnih tubula.

#### **4.2. Broj sigma 1 imunoreaktivnih distalnih tubula u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini**

Izbrojali smo sve imunoreaktivne distalne tubule u obje skupine i usporedili ih. Uočili smo da se broj imunoreaktivnih tubula značajno smanjio s vremenom u kontrolnim skupinama ( $P < 0,001$ ; Slika 2E). Nasuprot tome, broj sigma 1 imunoreaktivnih tubula u bubrezima dijabetičnih štakora značajno se povećao s vremenom ( $P < 0,001$ ; Slika 2E). Razlike između dviju skupina iste dobi također su bile izražene. Broj sigma 1 imunoreaktivnih distalnih tubula bio je značajno niži u skupini dijabetičnih štakora, u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti tip 1 ( $P < 0,01$ ; slika 2E). Najveći broj sigma 1 pozitivnih distalnih tubula otkriven je u štakora sa šećernom bolesti 2 mjeseca nakon indukcije bolesti, što je značajno više nego u odgovarajućoj kontrolnoj skupini ( $P < 0,001$ ; Slika 2D i E); u kojoj je opažen najmanji broj imunoreaktivnih distalnih tubula (Slika 2B i E).

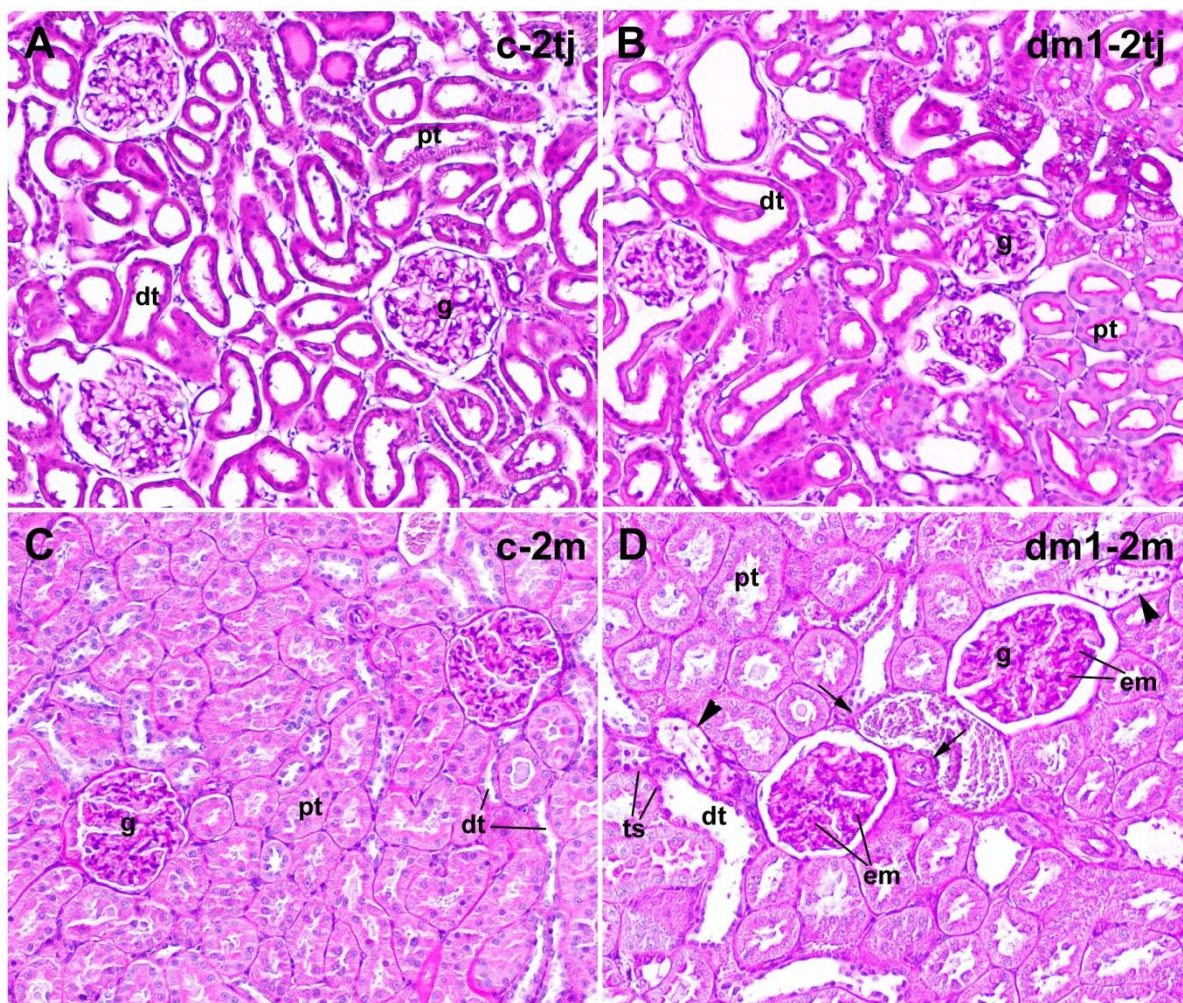
#### **4.3. Površina sigma 1 imunoreaktivnosti u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini**

Analizirali smo površinu sigma 1 imunoreaktivnosti u histološkim rezovima bubrega štakora. Utvrđena je značajna razlika između dvije skupine dijabetičnih štakora ( $P < 0,01$ ; Slika 2F), ali ne i između dvije kontrolne skupine. Površina područja sigma 1 imunoreaktivnosti bila je najviša u bubrezima dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti, što je bilo značajno više u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu, kao i u usporedbi s dijabetičnim štakorima 2 tjedna nakon injekcije STZ (oba  $P < 0,01$ ; Slika 2D i F).

Značajna razlika je uočena između kontrolnih štakora i dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti, za razliku od skupina štakora žrtvovanih 2 tjedna nakon indukcije. Najveća površina je zabilježena u skupini dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a, a najmanja površina zabilježena je u skupini kontrolnih štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti.

#### **4.4. Kolokalizacija sigma 1 receptora i čimbenika rasta i transformacije $\beta$ (TGF $\beta$ ) u bubregu dijabetičnih štakora**

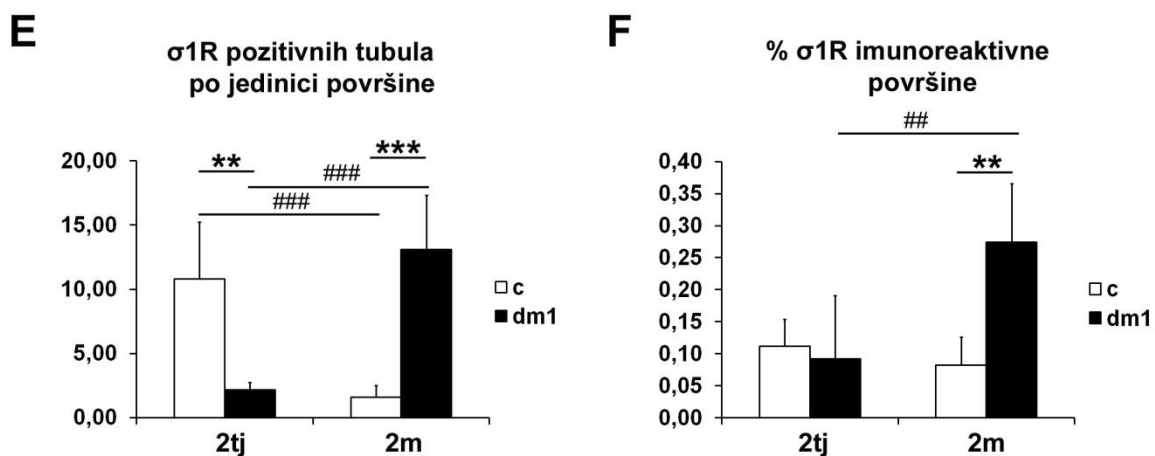
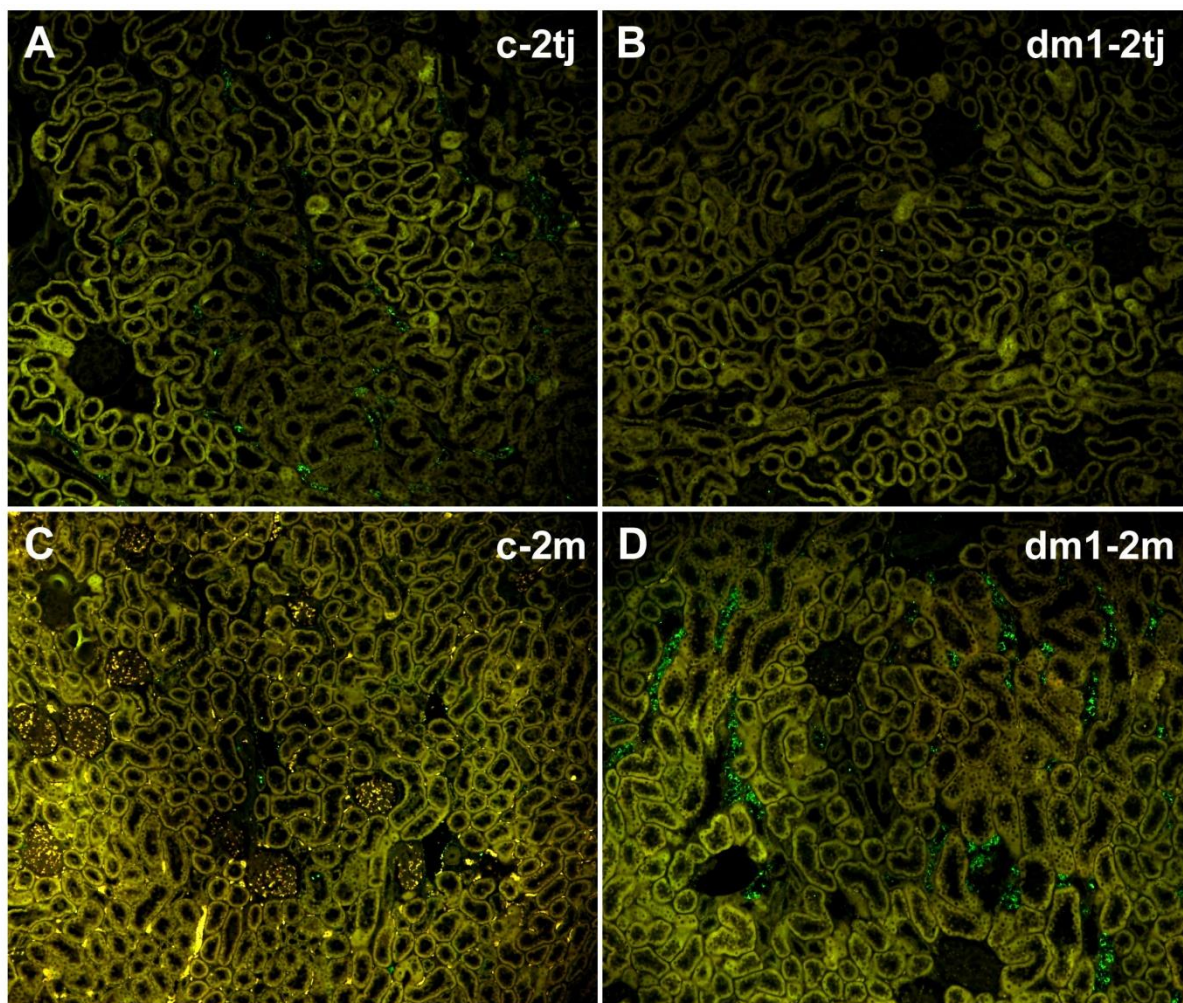
Na histološkim rezovima bubrega štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti tipa 1, obojene imunohistokemijski protutijelima protiv  $\sigma$ 1R i TGF $\beta$  vidljiv je jaki izražaj usporedno i  $\sigma$ 1R i proupalnog čimbenika TGF $\beta$  u vakuoliziranim stanicama distalnih tubula (Slika 3).



**Slika 1. Periodic acid-Schiff (PAS) histološko bojanje rezova bubrega štakora u modelu šećerne bolesti tipa 1**

A-D – reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega štakora. c – kontrolna skupina; dm1 – dijabetična skupina; 2tj – 2 tjedna nakon početka pokusa; 2m – 2 mjeseca nakon početka pokusa. U rezovima bubrega štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti (dm1-2m) vide se patološke promjene u vidu ekspanzije mezangija (em), tubularne skleroze (ts), nakupljanja hijalinog materijala u stijenkama krvnih žila (strjelica) i vakuolizacije stanica distalnih tubula (vrh strjelice); g – glomerul; pt – proksimalni tubul; dt – distalni tubul.

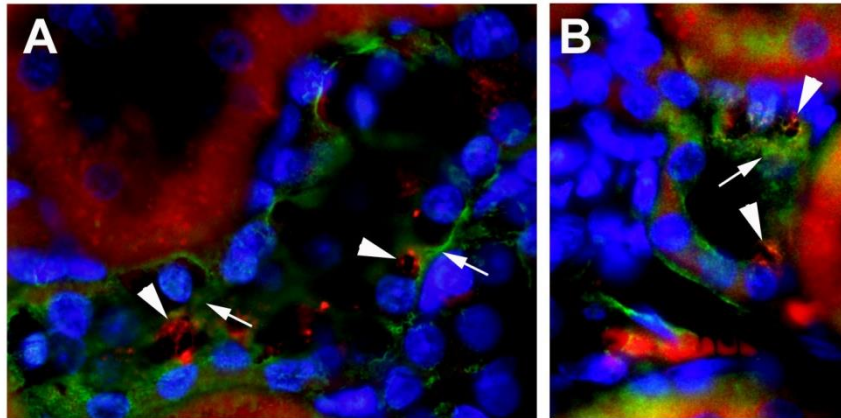




**Slika 2. Izražaj sigma 1 receptora u bubregu štakora u modelu šećerne bolesti tipa 1**

A-D – reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega štakora, obojene imunohistokemijski protutijelima protiv  $\sigma$ 1R (zeleno). E – rezultati analize broja  $\sigma$ 1R-imunoreaktivnih distalnih tubula po jedinici površine tkivnih rezova. F – rezultati analize postotka  $\sigma$ 1R-imunoreaktivne površine tkivnih rezova. c – kontrolna skupina; dm1 –

dijabetična skupina; 2tj – 2 tjedna nakon početka pokusa; 2m – 2 mjeseca nakon početka pokusa. \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$  u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu; ## -  $P < 0,01$ ; ### –  $P < 0,001$  u odnosu na istu skupinu 2 tjedna nakon početka pokusa.



**Slika 3. Kolokalizacija sigma 1 receptora i čimbenika rasta i transformacije  $\beta$  (TGF $\beta$ ) u bubregu dijabetičnih štakora**

A i B – reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti tipa 1, obojene imunohistokemijski protutijelima protiv  $\sigma 1R$  (crveno) i TGF $\beta$  (zeleno). U vakuoliziranim stanicama distalnih tubula vidljiv je jaki izražaj usporedno i  $\sigma 1R$  (vršak strjelice) i proupalnog čimbenika TGF $\beta$  (strjelica). Modro – jezgre stanica.

## **5. RASPRAVA**



Istražili smo izražaj  $\sigma 1R$  u bubrezima dijabetičnih štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon što smo im inducirali šećernu bolest injekcijom STZ-a otopljenom u citratnom puferu. U istraživanju smo koristili Sprague-Dawley štakore. Parafinske rezove bubrega štakora smo obojili imunofluorescencijski, zatim uslikali na mikroskopu, a dobivene mikrofotografije obradili u ImageJ softveru. Naknadno smo napravili i PAS histološko bojanje. Svrha istraživanja je bila utvrditi promjene izražaja  $\sigma 1R$  u bubrezima, koje bi posredno ukazivale na njihovu eventualnu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije. Sigma receptori vežu širok spektar kemijskih spojeva vrlo različitih strukturnih klasa i različitih terapijskih i farmakoloških svojstava. Sigma receptori su izvorno otkriveni u SŽS-u, ali ih nalazimo i u različitim drugim tkivima, uključujući bubreg (21). Dosadašnja istraživanja ukazuju na najveći izražaj  $\sigma 1R$  u bubrežnoj kori, posebice u stanicama proksimalnog tubula (24). Dosadašnja istraživanja uloge  $\sigma R$  u bubregu uglavnom su se fokusirala na istraživanje IRI, pri čemu je utvrđeno da je njihov učinak većinom posredovan modulacijom signalnog puta NO (24).

Usporedbom broja  $\sigma 1R$  imunoreaktivnih distalnih tubula utvrdili smo značajno smanjenje broja pozitivnih distalnih tubula s vremenom u kontrolnim skupinama. Za razliku od toga broj pozitivnih  $\sigma 1R$  distalnih tubula se značajno povećao s vremenom u dijabetičnoj skupini. Dva 2 tjedna nakon injekcije STZ-a broj pozitivnih distalnih tubula je bio niži u dijabetičnoj skupini, dok je broj imunoreaktivnih distalnih tubula značajno porastao i bio veći u usporedbi s kontrolnom skupinom 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti. Najveći broj imunoreaktivnih distalnih tubula u bubrezima štakora uočen je u dijabetičnoj skupini 2 mjeseca od indukcije bolesti, a najmanji broj kod pripadajuće kontrolne skupine.

Za razliku od broja imunoreaktivnih distalnih tubula, površina  $\sigma 1R$  imunoreaktivnosti nije se razlikovala u dijabetične, u odnosu na kontrolnu skupinu 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti, ali je značajno porasla 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a, kada je zabilježena i najveća vrijednost.

PAS bojanjem uočeno je da kod štakora 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti i njihove odgovarajuće kontrolne skupine odnosno kod štakora starih 10 tjedana distalni tubuli nisu još potpuno razvijeni, te imaju širok lumen. Za razliku od toga kod kontrolne skupine 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti vide se potpuno razvijeni tubuli. U skupini štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti vidljive su patološke promjene karakteristične za šećernu bolest: ekspanzija mezangija, tubularna skleroza, nakupljanje hijalinog materijala u

stijenkama krvnih žila i vakuolizacija stanica distalnih tubula. S obzirom na ove rezultate, visoki broj distalnih tubula imunoreaktivnih na  $\sigma$ 1R u kontrolne skupine kod mladih životinja, mogao bi ukazivati na ulogu ovih receptora u postnatalnom sazrijevanju distalnih tubula. Budući da se u novije vrijeme utvrdilo da je učinak  $\sigma$ 1R u bubrežnoj ishemiji većinom posredovan modulacijom signalnog puta NO, navedeni visoki izražaj  $\sigma$ 1R mogao bi se povezati s poznatom ulogom NO u postnatalnom razvoju tubula i glomerula (25).

S obzirom na važnost signalnog puta NO u patogenezi dijabetičke nefropatije za pretpostaviti je da i sigma receptori imaju važnu ulogu u patogenezi ovoga stanja (26,27,28). S navedenim su u suglasju naši rezultati, koji ukazuju na značajno povećanje izražaja  $\sigma$ 1R u distalnim tubulima dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti. Za uočiti je da je najveći izražaj  $\sigma$ 1R zabilježen u distalnim tubulima, a koje strukture su u našem istraživanju bile najjače oštećene. Štoviše, rezultati našeg istraživanja pokazali su kolokalizaciju  $\sigma$ 1R i upalnog čimbenika rasta TGF $\beta$  upravo u vakuoliziranim stanicama distalnih tubula dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1.  $\sigma 1R$  najjače su izraženi u distalnim tubulima bubrega štakora.
2. Jaki izražaj  $\sigma 1R$  u distalnim tubulima zdravih mladih štakora ukazuje na njihovu ulogu u postnatalnom razvoju ovih struktura.
3. Porast izražaja  $\sigma 1R$  u distalnim tubulima dijabetičnih štakora ukazuje na njihovu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije.

## **7. POPIS LITERATURE**

1. Diabetes mellitus [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2018 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2011;34:S62–9.
3. What is diabetes [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>
4. Diabetes Symptoms [Internet]. Arlington, American Diabetes Association; 2018 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/symptoms/>
5. Epidemiološki podaci o šećernoj bolesti [Internet]. Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/epidemioloski-podaci-o-secernoj-bolesti/>
6. Nacionalni program-Dijabetes [Internet]. Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2013 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/nacionalni-program-dijabetes/>
7. Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske. Nacionalni program zdravstvene zaštite osoba sa šećernom bolesti 2015.-2020. [Internet]. Zagreb, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske; 2015 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Nacionalni-program-zdravstvene-za%C5%A1tite-osoba-sa-%C5%A1e%C4%87ernom-bole%C5%A1%C4%87u-2015\\_2020.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Nacionalni-program-zdravstvene-za%C5%A1tite-osoba-sa-%C5%A1e%C4%87ernom-bole%C5%A1%C4%87u-2015_2020.pdf)
8. Bilous R, Donnelly R. Handbook of Diabetes: Diagnosis and Classification of Diabetes. 4. izd. Wiley-Blackwell; 2010.
9. Diabetes mellitus [Internet]. Split, MSD priručnik dijagnostike i terapije; 2014 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/endokrinologija/secerna-bolest-i-otkloni-mijene-ugljikohidrata/diabetes-mellitus>
10. CroDiab registar [Internet]. Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2014 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/crodiab-registar/>
11. DKA (Ketoacidosis) & Ketones [Internet]. Arlington, American Diabetes Association; 2015 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/ketoacidosis-dka.html>
12. Facts About Type 2 [Internet]. Arlington, American Diabetes Association; 2015 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/facts-about-type-2.html>
13. What is diabetes. Types of diabetes [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/types-of-diabetes.html>

14. What is Gestational Diabetes? [Internet]. Arlington, American Diabetes Association; 2016 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/gestational/what-is-gestational-diabetes.html>
15. What is diabetes. Diabetes complications [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/complications.html>
16. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26:77-82.
17. Complications [Internet]. Arlington, American Diabetes Association [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/>
18. Diabetic Nephropathy [Internet]. New York, Medscape; 2018 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/238946-overview>
19. Kes P, Bašić-Jukić N. Dijabetička nefropatija. *Medix*. 2009;15:149-57.
20. Varghese RT, Jialal I. Diabetic Nephropathy [Internet]. *StatPearls*; 2018 - [ažurirano 15.11.2018.; pristupljeno 05.02.2019.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534200/>
21. Rousseaux CG, Greene SF. Sigma receptors [ $\sigma$ Rs]: biology in normal and diseased states. *J Recept Signal Transduct Res*. 2016;36:327-88.
22. Sigma Receptor [Internet]. Science Direct; 2015 [citirano 2019 Feb 4]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/sigma-receptor>
23. Hayashi T, Su TP. The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. *Curr Neuropharmacol*. 2005;3:267-80.
24. Hosszu A, Antal Z, Lenart L, Hodrea J, Koszegi S, Balogh DB i surd.  $\sigma$ 1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:152-65.
25. Vinturache AE, Smith FG. Glomerular and tubular effects of nitric oxide (NO) are regulated by angiotensin II (Ang II) in an age-dependent manner through activation of both angiotensin receptors (AT1Rs and AT2Rs) in conscious lambs. *Pflugers Arch*. 2018;470:249-61.
26. Nogueira GB, Punaro GR, Oliveira CS, Maciel FR, Fernandes TO, Lima DY i surd. N-acetylcysteine protects against diabetic nephropathy through control of oxidative and nitrosative stress by recovery of nitric oxide in rats. *Nitric Oxide*. 2018;78:22-31.

27. Wang Y, An W, Zhang F, Niu M, Liu Y, Shi R. Nebivolol ameliorated kidney damage in Zucker diabetic fatty rats by regulation of oxidative stress/NO pathway: Comparison with captopril. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45:1135-48.
28. Jiang Y, Liu J, Zhou Z, Liu K, Liu C. Diosmetin Attenuates Akt Signaling Pathway by Modulating Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (NF- $\kappa$ B)/Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Nephropathy Mice. *Med Sci Monit*. 2018;24:7007-14.



## **8. SAŽETAK**

Sigma receptori su izvorno otkriveni u živčanom sustavu, ali ih nalazimo i u različitim drugim tkivima, uključujući bubreg. Dosadašnja istraživanja ukazuju na renoprotektivno djelovanje  $\sigma$ 1R koje je većinom posredovano modulacijom signalnog puta dušikovog oksida. S obzirom na važnost ovog signalnog puta u patogenezi dijabetičke nefropatije za pretpostaviti je da i  $\sigma$ 1R imaju važnu ulogu u patogenezi ovoga stanja.

Svrha istraživanja je bila utvrditi promjene izražaja  $\sigma$ 1R u bubrezima, koje bi posredno ukazivale na njihovu eventualnu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije.

Istraživanje je provedeno na Sprague Dawley štakorima. Model šećerne bolesti tipa 1 izazvan je injekcijom streptozotocin (55 mg/kg). U pokus su uključeni štakori kojima je 4. dan nakon indukcije šećerne bolesti izmjerena koncentracija glukoze u krvi  $>16.5$  mmol/L. Nakon 2 tjedna odnosno 2 mjeseca životinje su eutanazirane te je uzet uzorak tkiva bubrega. Tkivo je pripremljeno te su napravljeni parafinski rezovi, te obojeni imunofluorescencijski i histološkom tehnikom PAS. Obojeni rezovi fotografirani su te su dobivene mikrofotografije analizirane korištenjem ImageJ. Za statističku analizu korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Tukey-ev test za višestruke usporedbe (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD).

Kod dijabetične skupine štakora 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a vidljive su patološke promjene u bubregu. Te promjene su: ekspanzija mezangija, tubularna skleroza, nakupljanje hijalinog materijala u stijenkama krvnih žila i vakuolizacije stanica distalnih tubula. Analiziran je broj  $\sigma$ 1R imunoreaktivnih distalnih tubula i uočeno da u kontrolnim skupinama broj pozitivnih distalnih tubula opada s vremenom, dok u dijabetičnim skupinama raste (oba  $P<0,001$ ). Broj pozitivnih tubula bio je značajno niži u dijabetičnoj skupini 2 tjedna nakon injekcije STZ-a u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $P<0,01$ ); dok je broj  $\sigma$ 1R pozitivnih tubula bio statistički značajno veći u dijabetičnoj skupini 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $P<0,001$ ). Površina  $\sigma$ 1R imunoreaktivnosti bila je statistički značajno veća u dijabetičnoj skupini 2 mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali i u usporedbi s dijabetičnom skupinom 2 tjedna nakon indukcije šećerne bolesti (oba  $P<0,01$ ). U vakuoliziranim stanicama distalnih tubula dijabetičnih štakora 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a uočena je kolokalizaciju  $\sigma$ 1R i upalnog čimbenika rasta TGF $\beta$ .

Našim istraživanjem utvrdili smo najjači izražaj  $\sigma 1R$  u stanicama distalnih tubula bubrega štakora. Dinamika izražaja ovih receptora posredno ukazuje na njihovu ulogu u postnatalnom sazrijevanju bubrega štakora te u razvoju dijabetičke nefropatije, posebice oštećenja distalnih tubula.

## **9. SUMMARY**

Sigma receptors are originally detected in the nervous system, but they are also found in various other tissues, including the kidney. Previous studies indicate the renoprotective activity of  $\sigma 1R$ , which is mostly mediated by modulation of the nitric oxide signaling pathway. Considering the importance of this signaling pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy, it could be assumed that  $\sigma 1R$  have an important role in the pathogenesis of this condition.

The purpose of the study was to investigate changes in the expression of  $\sigma 1R$  in the kidneys, which could indicate their possible role in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

The research was carried out on Sprague Dawley rats. The type 1 diabetes mellitus was induced by the injection of streptozotocin (55 mg/kg). Rats with blood glucose level  $>16.5$  mmol/L on the 4th day following the induction of diabetes were included in the experiment. The animals were sacrificed 2 weeks or 2 months after diabetes induction and a kidney tissue sample was harvested. The tissue was embedded in paraffin and 5  $\mu$ m thick section were made, and stained with histological technique PAS and immunofluorescence method. Stained sections were photographed, and the resulting images were analyzed using ImageJ. For statistical analysis, a one-way variance analysis (ANOVA) and a Tukey test for multiple comparisons were used (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

In the kidney of the diabetic group of rats 2 months after injection of STZ, pathological changes characteristic for diabetes nephropathy were apparent, including: the expansion of mesangium, tubular sclerosis, the accumulation of hyaline material in the walls of the blood vessels and the vacuolization of distal tubule cells. The number of  $\sigma 1R$  immunoreactive distal tubules in the control groups decreased with time, while in diabetic groups it increased (both  $P<0.001$ ). The number of immunoreactive tubules was significantly lower in the diabetic group 2 weeks after STZ injection when compared to the corresponding control group ( $P<0.01$ ); while the number of  $\sigma 1R$  positive tubules was significantly higher in the diabetic group 2 months after the induction of diabetes in comparison to the corresponding control group ( $P<0.001$ ). The area of  $\sigma 1R$  immunoreactivity was significantly higher in the diabetic group 2 months after the induction of diabetes compared to the control group, but also in comparison with the diabetic group 2 weeks after the induction of diabetes (both  $P<0.01$ ). In vacuolated distal tubule cells of diabetic rats 2 months after injection of STZ, colocalization of  $\sigma 1R$  and inflammatory growth factor  $TGF\beta$  was observed.

Our research has shown the strongest expression  $\sigma 1R$  in the distal tubules in kidney of the rats. The dynamics of the expression of these receptors indicate their role in postnatal etiology of kidney maturation and in the development of diabetic nephropathy, in particular in the damage of distal tubules.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODATCI**

IME I PREZIME: Ivana Milardović

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 06. kolovoza 1994. Split, Hrvatska

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

ADRESA STANOVANJA: Mandićeva 41a, 21000, Split

E-ADRESA: ivanamilardovic94@gmail.com

## **OBRAZOVANJE**

2013. - 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet,  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2009. - 2013. Četvrta gimnazija Marko Marulić, Split

2001. - 2009. Osnovna škola Dobri, Split

## **RADNO ISKUSTVO:**

**ožujak 2018.- rujan 2018.** Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske  
županije, Ljekarna „Dobri“.

## **AKTIVNOSTI NA FAKULTETU**

2017. -Nagrada za znanstveni rad "Antioksidacijska svojstva i sastav ekstrakta zelenog čaja u  
ovisnosti načinu pripreme" na 6. Simpoziju studenata farmacije i biokemije „FARMEBS“.

## **ZNANJA I VJEŠTINE:**

-engleski jezik (B2),

-vozačka dozvola B kategorije

-rad u programima Microsoft Office i Esculap 2000