

# Izražaj koneksina u kralježničnoj moždini štakora s kratkotrajnim dijabetesom tipa 1

---

**Dužević, Silvia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:171:305862>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**SILVIA DUŽEVIĆ**

**IZRAŽAJ KONEKSINA U KRALJEŽNIČNOJ MOŽDINI  
ŠTAKORA S KRATKOTRAJNIM DIJABETESOM TIPA 1**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2019./2020.**

**Mentor: izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović**

**Split, srpanj 2020.**

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>1.1. Šećerna bolest tip 1</b> .....  | 3  |
| <b>1.2. Šećerna bolest tip 2</b> .....  | 4  |
| <b>1.3. Komplikacije šećerne bolesti</b> .....  | 5  |
| <b>1.4. Periferna neuropatija</b> .....   | 7  |
| <b>1.5. Koneksini</b> .....   | 9  |
| <b>1.6. Koneksini 37 (Cx37), 40 (Cx40), 43 (Cx43), 45 (Cx45)</b> .....  | 11 |
| <b>1.7. Kralježnična moždina</b> .....  | 12 |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....   | 16 |
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....  | 18 |
| <b>3.1. Etika</b> .....   | 19 |
| <b>3.2. Eksperimentalne životinje</b> .....   | 19 |
| <b>3.3. Model šećerne bolesti u štakora</b> .....   | 19 |
| <b>3.4. Priprema tkiva za bojanje</b> .....   | 19 |
| <b>3.5. Imunohistokemija</b> .....  | 20 |
| <b>3.6. Analiza fotografija tkiva i kvantifikacija</b> .....  | 20 |
| <b>3.7. Statistička analiza podataka</b> .....  | 21 |
| <b>4. REZULTATI</b> .....   | 22 |
| <b>4.1. Promjene izražaja koneksina 37 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1</b> ..... | 23 |
| <b>4.2. Promjene izražaja koneksina 40 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1</b> ..... | 26 |
| <b>4.3. Promjene izražaja koneksina 43 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1</b> ..... | 29 |
| <b>4.4. Promjene izražaja koneksina 45 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1</b> ..... | 32 |
| <b>5. RASPRAVA</b> .....  | 37 |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b> .....   | 45 |
| <b>7. POPIS LITERATURE</b> .....  | 47 |
| <b>8. SAŽETAK</b> .....   | 55 |
| <b>9. SUMMARY</b> .....   | 58 |
| <b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....  | 61 |

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović na brojnim satima uložnim u istraživanje, u pisanje, na mnogim savjetima, pomoći, konstruktivnim kritikama i naravno dobrom društvu. Zahvaljujem svojim roditeljima, bratu, Missy i prijateljima na strpljenju i bezuvjetnoj podršci.*

## **1. UVOD**

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*; DM) najčešći je endokrinološki metabolički poremećaj u kojemu zbog nedostatnog izlučivanja ili djelovanja inzulina, ili oboje, dolazi do porasta razine glukoze u krvi (hiperglikemije) (1).

Dijelimo ga u tri osnovne vrste: DM ovisan o inzulinu (tip 1; DM1), inzulin neovisni dijabetes melitus (tip 2; DM2) i gestacijski dijabetes. DM1 je autoimuna bolest karakterizirana lokalnom upalnom reakcijom u i oko Langerhansovih otočića nakon čega dolazi do selektivnog uništavanja gušterače i smanjene proizvodnje inzulina dok DM2 karakterizira povećana inzulinska sekrecija i periferna inzulinska rezistencija što konačno dovodi do smanjene inzulinske sekrecije i hiperglikemije. Gestacijski dijabetes se pojavljuje u žena koje tijekom trudnoće razviju visoku razinu glukoze u krvi, a da pritom nisu i prije bolovale od dijabetesa (2).

Procijenjeno je da je u svijetu 2000. godine bilo 151 milijun odraslih koji boluju od dijabetesa. Do 2009. godine broj je porastao na 285 milijuna (za 88%). Danas na svijetu 463 milijuna ljudi, od čega 9.3% odraslih u dobi od 20 do 79 godina, živi s dijabetesom. Također 1,1 milijuna djece i adolescenata mlađih od 20 godina živi s dijabetesom tipa 1. Sve veći broj i rasprostranjenost dijabetesa u svijetu posljedica je složene interakcije socioekonomskih, demografskih, okolišnih i genetskih čimbenika. Iznimno brz rast broja oboljelih uglavnom je posljedica porasta učestalosti dijabetesa tipa 2 i vezanih čimbenika rizika, koji uključuju porast razine pretilosti, nezdrave prehrane i raširene tjelesne neaktivnosti. Međutim, u porastu je također i učestalost dijabetesa tipa 1 u djetinjstvu (3).

Simptomi izrazite hiperglikemije uključuju poliuriju, polidipsiju, polifagiju, gubitak tjelesne težine i zamagljen vid. Veća učestalost infekcija također prati kroničnu hiperglikemiju. Akutne, po život opasne posljedice nekontroliranog dijabetesa su hiperglikemija s ketoacidozom ili neketotični hiperosmolarni sindrom (4).

*Diabetes mellitus* karakterizira ponavljajući ili postojani visoki šećer u krvi, a dijagnosticira se pomoću različitih testova (1):

- razina glukoze u plazmi natašte  $\geq 7.0$  mmol/L (126 mg/dL)
- glukoza  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL) dva sata nakon oralnog opterećenja sa 75g glukoze u testu tolerancije na glukozu (OGTT)
- simptomi visokog šećera u krvi i nasumično mjerenje  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL)
- glikozilirani hemoglobin (HbA1C)  $\geq 48$  mmol/mol ( $\geq 6,5$  %)

Liječenje dijabetesa tipa 1 temelji se na cjeloživotnoj nadoknadi inzulina. U većine pacijenata neophodna je primjena više od dvije injekcije inzulina dnevno te kombinacija različitih vrsta inzulina za zadovoljavajuću regulaciju razine šećera u krvi. Dugogodišnje liječenje zahtijeva multidisciplinarni pristup koji uključuje liječnike, medicinske sestre, nutricioniste i ostale stručnjake (5).

Liječenje dijabetesa tipa 2 uključuje opće mjere kao što su gubitak težine, zdrava prehrana, redovita tjelovježba te lijekove ili inzulinsku terapiju. Određeni broj ljudi koji imaju dijabetes tipa 2 može postići svoju ciljanu razinu šećera u krvi dijetom i vježbanjem, ali mnogi također trebaju lijekove (antidijabetike). Odluka o tome koji su lijekovi najprikladniji ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući razinu šećera u krvi i ostale komorbiditete. Primjeri lijekova koji se koriste su metformin, sulfonilureja, tiazolidindioni, inhibitori dipeptidil peptidaze 4 (DPP-4), agonisti receptora glukagonu sličnog peptida (GLP), inhibitori suprijenosnika natrija i glukoze 2 (SGLT2) te inzulin koji se prije koristio kao jedan od zadnjih izbora, međutim uočena je korisnost uzimanja inzulina u dijabetesu tipa 2 u ranijoj fazi (6).

### **1.1. Šećerna bolest tip 1**

Dijabetes tipa 1 kronična je bolest uzrokovana imuno posredovanim uništavanjem beta stanica gušterače. Uništavanje beta stanica rezultira insuficijencijom i nedovoljnim lučenjem inzulina, a pacijenti razvijaju po život opasnu hiperglikemiju, koja se klinički očituje gubitkom težine, poliurijom i polidipsijom (7).

Biljezi imunološkog razaranja beta stanica uključuju autoantitijela na otočice gušterače, autoantitijela na inzulin, autoantitijela na glutamat dekarboksilazu (GAD) i autoantitijela na tirozin fosfataze IA-2 i IA-2 $\beta$ . Također, u patogenezi autoimunog razaranja beta stanica ulogu imaju geni unutar velikog kompleksa histokompatibilnosti (MHC), i to DQA, DQB i DRB geni koji se nalaze u >90% bolesnika s DM1 (1)(4). Osim nasljednih čimbenika pojavi dijabetesa mogu doprinijeti jedan ili više okolišnih čimbenika, poput virusne infekcije ili prehrane (8). DM1 jedna je od najčešćih kroničnih bolesti u djetinjstvu i dijagnosticira se sa sve većom stopom i kod odraslih. Stopa incidencije značajno varira od

geografske regije do regije. Učestalost bolesti raste u većini zemalja, s tim da se stopa dramatično povećava u djece mlađe od 5 godina. Švedska, Finska, Norveška, Velika Britanija i Sardinija imaju najveću incidenciju dijabetesa tipa 1 na svijetu (7).

Brzina uništavanja  $\beta$ -stanica prilično je promjenjiva: kod nekih osoba je brza (uglavnom novorođenčad i djeca), a kod drugih (uglavnom odrasli) spora. U djece i adolescenata dijabetička ketoacidoza (DKA) može predstavljati prvu manifestaciju bolesti (4). Ketoacidozu možemo opisati kao biokemijski trijas hiperglikemije, ketonemije i acidemije koji, ukoliko je neprepoznat, može dovesti do smrtnog ishoda (9). Ostali pacijenti imaju hiperglikemiju u gladovanju, koja može brzo prijeći u tešku hiperglikemiju i/ili dijabetičku ketoacidozu zbog infekcije ili drugog stresa. Odrasli pacijenti mogu zadržati dovoljnu količinu i održanu funkciju  $\beta$ -stanica da spriječe DKA više godina; takvi pojedinci na kraju postaju ovisni o inzulinu i u riziku su za razvoj DKA. U posljednjem stadiju bolesti, izlučivanje inzulina je malo ili nepostojeće, što se očituje niskom razinom C-peptida u plazmi. Imunološki posredovani dijabetes obično se javlja u djetinjstvu i adolescenciji, ali može se pojaviti u bilo kojoj dobi, čak i u 8. i 9. desetljeću života (4).

Trenutno standardno liječenje DM1 je egzogena nadomjesna terapija inzulinom. Nove vrste inzulina, moderni nadzor glikemije i tehnike davanja inzulina revolucionirali su mogućnosti suvremene inzulinske terapije te pokazali važnost ranog liječenja i kontrole glukoze za smanjenje rizika od razvoja dijabetičkih komplikacija. Transplantacija beta otočića, kao jedna od novijih metoda, učinkovit je pristup za liječenje bolesnika s dijabetesom tipa 1 u budućnosti (10).

## **1.2. Šećerna bolest tip 2**

Dijabetes tipa 2 bolest je u kojoj dolazi do lučenja nedovoljno inzulina (nedostatak inzulina), ili tjelesne stanice ne mogu pravilno iskoristiti inzulin (inzulinska rezistencija). Inzulin, hormon koji stvaraju  $\beta$ -stanice u gušterači, kontrolira razinu šećera u krvi. Inzulinska rezistencija povezana je s genetskim čimbenicima, pretilošću, sjedilačkim načinom života i starenjem. Konzumiranje visokokalorične hrane i tjelesna neaktivnost važni su prediktori pretilosti i DM2 (4, 11).



Beta stanice gušterače reagiraju na inzulinsku rezistenciju povećavajući izlučivanje inzulina da zadovolje potrebe tkiva i organizma. Razvoj dijabetesa tipa 2 u biti proizlazi iz neuspjeha  $\beta$ -stanica da adekvatno nadoknade rezistenciju na inzulin. Disfunkcija  $\beta$ -stanica s vremenom napreduje te se nastavlja pogoršavati i nakon što se razvije dijabetes. Mnogo pretilih osoba, sklonih inzulinskoj rezistenciji, boluje od dijabetesa. No neki ipak ne obole jer njihove  $\beta$ -stanice i dalje djeluju na odgovarajući način te su sposobne održavati homeostazu glukoze i nadoknađivati pogoršanje inzulinske rezistencije povećanjem izlučivanja inzulina (12).

DM2 javlja se najčešće kod odraslih u dobi od 40 godina ili starijih, a prevalencija bolesti povećava se s napredovanjem dobi. Starenje stanovništva jedan je od razloga što DM2 se sve češće pojavljuje. Gotovo svi slučajevi šećerne bolesti u starijih osoba su tip 2. Top 10 zemalja po broju oboljelih od dijabetesa tipa 2 trenutno su Indija, Kina, Sjedinjene Države, Indonezija, Japan, Pakistan, Rusija, Brazil, Italija i Bangladeš. Najveće povećanje broja oboljelih u sljedećih 20 godina očekuje se u Africi. Nažalost, u najmanje 80% ljudi u Africi koji imaju dijabetes bolest nije dijagnosticirana, a predviđa se da će mnogi u dobi od 30 do 60 godina umrijeti od dijabetesa (13).

Dijabetes tipa 2 može se lako ignorirati, posebno u ranim fazama kada dominiraju simptomi poliurije i polidipsije. No kasnije, dijabetes oštećuje mnoge vitalne organe, uključujući srce, krvne žile, živce, oči i bubrege (6, 13).

### **1.3. Komplikacije šećerne bolesti**

Iako se patofiziologija bolesti razlikuje među vrstama dijabetesa, većina komplikacija, uključujući mikrovaskularne i makrovaskularne, slična je bez obzira na vrstu dijabetesa. Čini se da je hiperglikemija glavna odrednica mikrovaskularnih i metaboličkih komplikacija. Makrovaskularna bolest može biti manje povezana s glikemijom (13). Pacijenti s DM2 podložniji su različitim oblicima kratkoročnih i dugoročnih komplikacija. One uključuju makrovaskularne bolesti (koronarna bolest arterija, srčani i moždani udar, cerebralne vaskularne bolesti i periferna krvožilna bolest), mikrovaskularne bolesti (retinopatija, nefropatija i neuropatija) i karcinome (14).

Kardiovaskularna bolest vodeći je uzrok mortaliteta i morbiditeta u dijabetesu, a kao potencijalni mehanizam nastanka spominje se oksidativni stres koji ima važnu ulogu u aterogenezi te također doprinosi oksidaciji lipoproteina niske gustoće (LDL). Prevencija ranih kardiovaskularnih događaja uključuje kombinacije lijekova, i to antihipertenziva, statina i primjenu aspirina u malim dozama (14).

Retina je područje tijela koje je najviše vaskularizirano zbog visokih potreba za kisikom nužnim za pretvaranje svjetlosti u električni impuls pomoću štapića i čunjića. Kronična hiperglikemija uzrokuje mikrovaskularno oštećenje žila mrežnice putem različitih mehanizama. Krajnji rezultat je propusnost krvnih žila koja uzrokuje edeme i/ili krvarenje u mrežnicu ili staklasto tijelo te na kraju dovodi do sljepoće (15).

Dijabetička nefropatija jedna je od najvažnijih mikrovaskularnih komplikacija, čija je najranija manifestacija prisutnost malih količina proteina u mokraći, proteinurija (14). Proteinurija se javlja kod 15–40% bolesnika s dijabetesom tipa 1, dok se kreće od 5 do 20% u bolesnika s tipom 2 (16). Nakon dugog asimptomatskog perioda bolest obično završava kao bubrežno zatajenje te zahtjeva transplantaciju ili dijalizu (15).

U pacijenata s dijabetesom također se razvija neuropatija, što može dovesti do ulkusa na stopalima, amputacije, seksualne disfunkcije i rana na koži (17). Neuropatija dovodi do gubitka osjećaja u stopalima, koji postaju skloniji ulceraciji i drugim ozljedama. To nadalje dovodi do infekcije kože (celulitis) i/ili kostiju stopala (osteomijelitis) i gangrene. Periferna neuropatija povezana s kroničnom hiperglikemijom sprječava odgovarajuću oksigenaciju ozlijeđenih tkiva i onemogućuje zacjeljivanje rana (14, 15).

## 1.4. Periferna neuropatija

Periferne neuropatije obuhvaćaju poremećaje perifernih živčanih stanica i vlakana koji se manifestiraju različitom patologijom. Ti živci uključuju kranijalne živce, korijene spinalnih živaca i ganglije te živce autonomnog živčanog sustava (18, 19).

Postoji nekoliko različitih klasifikacija perifernih neuropatija, uključujući podjelu na mononeuropatije, multifokalne neuropatije i polineuropatije. Daljnje podklasifikacije dijele periferne neuropatije kao aksonske, demijelinizacijske ili miješane, što je bitno za potrebe liječenja. Najčešći simptomi periferne neuropatije uključuju neosjetljivost i parestezije, bol, slabost i gubitak dubokih tetivnih refleksa. Periferne neuropatije obično se razvijaju mjesecima ili godinama, dok se neke mogu razvijati brže i biti progresivne prirode (19). Polineuropatije (periferne neuropatije) su najčešći tip poremećaja perifernog živčanog sustava kod odraslih, posebno u starijih osoba, s prevalencijom od 5 do 8%, ovisno o dobi. Zbog pandemije predijabetesa i dijabetesa, dijabetička neuropatija (DN) je najčešća polineuropatija u svijetu. Prevalencija DN-a je 8% -54% kod dijabetesa tipa 1 i 13% -46% kod dijabetesa tipa 2 (20). Od ostalih uzroka tu su kronični alkoholizam, nedostaci određenih tvari (npr. B1, B6, B12, vitamin E), upalna stanja (npr. vaskulitis), hipotireoza, autoimune bolesti (npr. Sjogrenov sindrom, lupus, reumatoidni artritis), infekcije (npr. lajmska bolest, virus Epstein-Barra, hepatitis C, HIV), Guillain-Barre sindrom, toksini (teški metali, kemikalije), lijekovi (antibiotici), kemoterapeutici, tumori, nasljedna stanja (npr. Charcot-Marie-Tooth), traume/ozljede (19) itd.

Čimbenici koji dovode do neuropatije u osoba sa šećernom bolešću još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, no općenito je prihvaćeno da se radi o kombinaciji više uzročnih faktora kao što su metaboličke i hemodinamske promjene, nedostatak neurotrofnih faktora, te autoimunost; što sve rezultira aktivacijom glija stanica, promjenama u izražaju natrijevih i kalcijevih kanala te aktivacijom različitih puteva za bol (21, 22). U osnovi poremećaja nalazi se hiperglikemija, uz koju značajnu ulogu ima genetska preosjetljivost te okolišni čimbenici. Šećerna bolest inducira metaboličke i hemodinamske defekte (mikroangiopatiju), koji su inicijalno reverzibilni, a dužim trajanjem vode u ireverzibilne promjene izazivajući oštećenja živaca i okluziju *vasa nervorum*. Imunološki mehanizmi mogu također utjecati na razvoj neurogenog oštećenja (22).

Na molekularnoj razini patogenetskih mehanizama dijabetičke neuropatije dolazi do aktivacije različitih staničnih puteva. Dugotrajna hiperglikemija uzrokuje hiperaktivnost putova poliola, povećanje broja krajnjih produkata glikacije (AGE) te njihovih vezanja za receptor za AGE (RAGE) te povećane razine oksidativnog stresa i slobodnih radikala. Usporedno sa stvaranjem slobodnih radikala tijekom glikolitičkog procesa, mitohondriji imaju ključnu ulogu u staničnoj smrti aktiviranjem specifičnih signala i sustavom endonukleaze (23). Prekomjerni unos glukoze u stanicu uzrokuje transport viška elektrona što rezultira stvaranjem radikala u mitohondrijima i dovodi do smanjenog djelovanja samog mitohondrija čime se smanjuje sinteza adenozin trifosfata (ATP-a). Uz mitohondrije, druge organele, poput Golgijevog aparata i endoplazmatskog retikuluma (ER) također se mogu smatrati važnim izvorom slobodnih radikala, što rezultira staničnom smrću. Kompromitiraju se i endoneurijalne krvne žile i sama živčana tkiva aktiviranjem poli-ADP-riboza polimeraza puta, mijenja se djelovanje protein kinaze C (PKC) te i aktiviranje nuklearnog čimbenika - (NF)  $\kappa$ B, što sve rezultira funkcionalnim i strukturnim promjenama karakterističnim za perifernu neuropatiju. Također i metaboličke promjene u živcu izazivaju pro-upalnu reakciju, izazivajući oslobađanje citokina, supresiju neurotropina i migraciju makrofaga te potiču razvoj neuropatije (21, 23).

Liječenje perifernih neuropatija temelji se na liječenju glavnog uzroka bolesti, odnosno kontroli razine glukoze u krvi kod dijabetičke neuropatije, zabrani konzumiranja alkohola kod alkoholne neuropatije, itd. Također se može primjenjivati fizikalna terapija radi poboljšanja ukupne snage i funkcije zahvaćenog dijela tijela. Kronična upalna demijelinizirajuća neuropatija liječi se u početku kortikosteroidima, ali se također može liječiti primjenom intravenskog imunoglobulina, nekih imunosupresiva i izmjenom plazme (19).

Neuropatska bol obično ne reagira na jednostavne analgetike. Umjesto toga, učinkovit tretman protiv bolova povezanih s perifernim neuropatijama može biti korištenje stabilizatora membrana, kao što su određeni antiepileptici, triciklički antidepresivi i opiodi. Neki od odobrenih su pregabalin, duloksetin i tapentadol (19, 21).

## 1.5. Koneksini

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da međustanična komunikacija igra značajnu ulogu u patofiziologiji šećerne bolesti i njezinih komplikacija (24). Uzevši u obzir središnju ulogu koneksina u međustaničnoj komunikaciji, navedeno se dovodi u svezu s poremećajima njihovog izražaja, lokalizacije i funkcije (25, 26). Koneksini su gradivni elementi međustaničnih spojeva, specijaliziranih veza koje omogućuju izravnu električnu i metaboličku komunikaciju između dviju susjednih stanica; stoga su vitalni za mnoge fiziološke procese. Kontrolirajući kretanje aminokiselina, drugih glasnika, iona i ostalih metabolita, međustanični spojevi koordiniraju staničnu signalizaciju i sudjeluju u širenju električnih signala (27, 28). U kralježnjaka, međustanične spojeve čine dva hemikanala (ili koneksiona), od kojih svaki pripada jednoj stanici. Svaki hemikanal sastoji se od šest proteina koneksina (skraćeno Cx), koji mogu biti ili homomerični ili heteromerični (dva ili više različitih koneksina u koneksionu) i tvore homotipske ili heterotipske (različiti koneksion) kanale. Obitelj koneksina kodirana je s 20 gena u miševa, a 21 u čovjeka, a imenovani su prema njihovoj molekularnoj masi u kDa i pokazalo se da se nalaze u gotovo svim tkivima sisavaca (28).

Molekula koneksina sastoji se od jednog citoplazmatskog N-kraja, dvije izvanstanične petlje, jedne citoplazmatske petlje, četiri transmembranske domene i jednog repa na C-kraju (28, 29).

Koneksini imaju kratak poluživot od samo nekoliko sati. Zbog toga su oni unaprijed programirani da se kontinuirano sintetiziraju i razgrađuju. Vjerojatno je da koneksini zadržavaju kratak poluživot kako bi odgovorili na fiziološke zahtjeve organizma bilo povećanjem ili smanjenjem stvaranja međustaničnih spojeva. Ovaj mehanizam najbolje se vidi u miometriju, gdje steroidni hormoni potiču 5 puta brže nastajanje spojeva neposredno prije početka porođaja (30).

Međustanični spojevi nisu stalno otvoreni već se otvaraju prema potrebi. Zatvoreni su pri niskom pH ili visokoj koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$ , što je čest slučaj u oštećenih stanicama pa se njihovim zatvaranjem sprječava prijenos na zdrave stanice (31). Otvoreni kanali dovode do oslobađanja molekula poput kalija, ATP-a i glutamata u izvanstaničnom prostoru, koji u fiziološkim uvjetima može modulirati aktivnost neurona, a pod patološkim uvjetima može u konačnici inducirati staničnu smrt (28).

Koneksini se sintetiziraju na ribosomima i ubacuju u endoplazmatski retikulum. Nakon toga, između ER i Golgijevog aparata (ovisno o tipu koneksina), slijedi oligomerizacija u koneksone, koji se zatim dostavljaju do membrane preko aktinskih ili mikrotubulnih vlakana. Mogu se također isporučiti membrani izravnim prijenosom iz zrnatog ER. Nakon umetanja u membranu, koneksioni mogu ostati kao hemikanali ili spojiti se s kompatibilnim koneksonima na susjednim stanicama kako bi tvorili međustanični spoj. Novo sintetizirani koneksioni dodaju se na periferiju prethodno oblikovanih spojeva, dok se središnji „stariji“ dio spoja razgrađuje u lizosomu ili proteosomu. U nekim slučajevima koneksini se recikliraju natrag u membranu (30). Hemikanali, građeni od koneksina, mogu se aktivirati u odgovoru na različite unutarstanične signale kao što su promjene pH, status fosforilacije te izvanstanične signale poput okruženja s niskom koncentracijom  $\text{Ca}^{2+}$ . Osjetljivi su i na mehaničke, oksidativne, metaboličke i ishemijske promjene (28).

Bolesti koje se dovode u vezu s mutacijama gena za koneksine su prilično česta sensorineuralna gluhoća (32) i rijetka okulodontodigitalna displazija (ODDD) (33). Prva otkrivena bolest vezana uz koneksine u ljudi bio je Charcot-Marie-Tooth sindrom povezan s mutacijom u genu za Cx32 koja se klinički očituje progresivnom perifernom demijelinizacijom aksona i slabošću udova (34).

## 1.6. Koneksini 37 (Cx37), 40 (Cx40), 43 (Cx43), 45 (Cx45)

U sisavaca je sveprisutno eksprimiran koneksin Cx43. Do sada je to jedan od najčešće istraženih i najraširenijih koneksina koji je eksprimiran u najmanje 35 različitih tkiva koja obuhvaćaju preko 35 tipova stanica koji između ostalih uključuju kardiomiocite, keratinocite, astrocite, endotelne stanice i glatke mišiće (30). Uz Cx43 kardiomiociti izražavaju i koneksine 40 i 45 (35). Koneksini 40 i 45 nalaze se i u keratinocitima u koži dok koneksin 37 najviše se nalazi u endotelu krvnih žila (30). Cx37 i Cx40 su jako izraženi u arterijama i arteriolama, dok se Cx43 nalazi u regijama s turbulentnim protokom krvi (36, 37).

Također nekoliko dokaza upućuje na mogući doprinos endotelnih koneksina u održavanju statusa propusnosti krvno-moždane barijere. Bradikinin, tipični upalni glasnik, povećava propusnost stanica krvno-moždane barijere i endotela mozga štakora putem povećanja razine kalcijjskih iona koji su uključeni u otvaranje hemikanala (38).

Nadalje, odsutnost astroglialnog Cx43 umanjuje sposobnost mozga da održava imunološku obranu, uključujući T stanice, B stanice, makrofage i neutrofile, a pritom pojačava prezentaciju antigena i jakost autoimune reakcije (39).

Koneksini se smatraju novim ciljevima za terapije neuroloških bolesti zbog svoje uloge u građi krvno-moždane barijere te njene povezanosti s neurološkim bolestima. Astrocitni i endotelni kanali od velike su važnosti za promjene propusnosti barijere uzrokovane različitim patološkim procesima, posebno upalom (40). U bolestima živčanog sustava, poput multiple skleroze, neuropatske boli, Alzheimerove bolesti i epilepsije, koneksini 37, 40, 43 i 45 pokazuju sve veći značaj (30).

## 1.7. Kralježnična moždina

Kralježnična moždina dio je središnjeg živčanog sustava (SŽS). Smještena je u kralježnom kanalu, zaštićena kralješcima. Okružena je trima ovojnicama SŽS-a: durom mater, arahnoidom i piom mater. Prema svom rostrokaudalnom položaju može se podijeliti u pet segmenata: cervikalni, torakalni, lumbalni, sakralni i trtični. Cervikalni i lumbalni su obilježeni proširenjem segmenata moždine. Za razliku od mozga, u kralježničnoj moždini siva tvar je okružena bijelom tvari (41). Bijela tvar se dijeli na dorzalne, dorzolateralne, lateralne, ventralne i ventrolateralne snopove (funikule). Bijela tvar postupno se smanjuje prema kraju kralježnične moždine, a siva tvar se stapa u jednu masu. Moždina završava tupim krajem - *conus terminalis*. Iz lumbosakralnog i kokcigealnog dijela moždine izlaze paralelni snopovi korijena živaca koji tvore takozvanu kaudu ekvinu (41). Siva tvar sadrži tijela neurona i glija stanice i podijeljena je u četiri glavna stupa (na presjeku rogovi): dorzalni rog, intermedijarni, lateralni i ventralni rog. Dorzalni rog sastoji se od senzornih jezgara koje primaju i obrađuju dolazne somatosenzorne informacije. Odatle se pojavljuju uzlazne projekcije koje prenose senzorne informacije u mezencefalon i diencefalon. Intermedijarni i lateralni rog sadrže neurone autonomnog sustava koji inerviraju visceralne i zdjelične organe. Ventralni rog sadrži motorne neurone koji inerviraju skeletne mišiće (42).

Raspodjela stanica i vlakana unutar sive tvari kralježnične moždine pokazuje obrazac laminacije. Svaka lamina sastoji se od neurona različitih oblika i veličina (citoarhitektura) zbog čega sivu tvar možemo podijeliti na 10 slojeva odnosno lamina (41, 42).

Lamine od I do IX su organizirane počevši od dorzalnog do ventralnog dijela sive tvari dok se lamina X nalazi centralno oko središnjeg kanala. U dorzalnom rogu nalaze se lamine od I do VI. Lamina I prisutna je u vrhu dorzalnog roga. Ova zona sadrži dvije vrste neurona; Waldeyerove stanice, koje se sastoje od srednjih ili malih neurona te velike i lako prepoznatljive stanice u blizini mjesta ulaska dorzalnih korijena. Neuroni u lamini I odgovaraju na bolne i termalne podražaje. Aksoni neurona lamine I tvore kontralateralni spinothalmički trakt. Ovaj sloj odgovara jezgri *nucleus posteromarginalis* (41-43).

Lamina II sastoji se od interneurona te odgovara zoni pod nazivom *substantia gelatinosa*. To su najmanje stanice u dorzalnom rogu, sastoje se od četiri vrste neurona i imaju obilje dendrita. Aksoni primarnih osjetnih neurona koji prenose osjet temperature i boli iz



perifernih receptora sinapsom će se spojiti u laminu I i II. Vlakna postsinaptičkih neurona će prijeći na drugu stranu preko prednje komisure i putovati spinothalamičkim putem do centra. Oni šalju aksone u lamine III i IV (*fasciculus proprius*). Lamina II važna je u modulaciji senzoričkog inputa pri čemu se ovdje određuje koji uzorak ulaznog inputa će se na kraju u mozgu interpretirati kao bolni podražaj (41-43).

Lamina III ima jednolike, velike, blijede živčane stanice sa svijetlom jezgrom i istaknutom jezgricom. Stanice ovoga sloja primaju aksodendritičke sinapse od A $\beta$  neurona spinalnog ganglija. Sadrži dendrite stanica iz lamina IV, V i VI, a većina neurona iz lamine II funkcionira kao propriospinalni/interneuroni (41-43).

Lamina IV sadrži skup stanica različitih veličina. Prisutnost velikih i malih stanica koje su jedna uz drugu karakteristična je za laminu IV. Ovi neuroni primaju A $\beta$  koji prenose pretežno ne-bolne informacije. Nadalje, dendriti ovih neurona šire se u laminu II i odgovaraju na podražaje kao što su fini dodir. Lamine III i IV odgovaraju području *nucleusa propriusa* te ovdje dolazi do prekapčanja spinothalamičkog puta. Ove dvije lamine uključene su u obradu osjeta vibracija i pritiska. Provode svjesni proprioceptivni impulsi u moždanu koru putem medijalnog lemniskusa (41-43).

Lamina V je najraznolikija lamina u dorzalnom rogu koja se sastoji od deset vrsta neurona i najviše dendritičkih veza. Ova lamina ima dvije zone nazvane medijalna i lateralna zona. Lateralna zona je mrežasto građena i ima tamno obojene stanice dok u medijalnoj zoni nalazimo svijetle stanice. Osjeti primljeni od kožnih, mišićnih, mehaničkih i visceralnih nociceptora obrađuju se u lamini V (41-43).

Lamina VI smještena je u bazi dorzalnog roga. To se područje dijeli na medijalnu zonu koja se sastoji od organiziranih malih stanica, i lateralnu zonu s nepravilnijim rasporedom većih stanica zvjezdastog oblika. Fleksijski refleks koji se događa kao reakcija na bolni podražaj, obrađuju mali neuroni u medijalnoj zoni lamine VI. Neuroni medijalne zone segmenata C8-L3 također primaju informacije iz mišićnih vretena i ovdje započinju ipsilateralni spinocerebelarni putevi. Silazni putevi iz moždanog debla također se projiciraju u laminu VI. Lamina VI djeluje zajedno s laminom VIII u koordiniranju kralježničnih refleksa unutar moždine (41-43).

Laminu VII nalazimo u lateralnom dijelu roga i prisutna je samo u području od T1-L2. Iznad i ispod ovih segmenata proteže se u prednji dio roga. Lamine VII i X nazivaju se

intermedijarna siva zona koja se dijeli na medijalnu i lateralnu zonu. Medijalnu zonu čine interneuroni i propriospinalni neuroni, i bitna je u refleksima, autonomnim funkcijama i regulaciji pokreta. Lateralnu zonu čine različite vrste neurona te sudjeluje u posturi tijela i u kretanju. Lamina VII sadrži Clarkeovu jezgru koja je prisutna od C8-L3. Ova medijalno smještena jezgra izvor je ipsilateralnog spinocerebelarnog puta koji provodi osjet nesvjesne propriocepcije. Intermediolateralna jezgra, također na području lamine VII, nalazi se lateralnije i pruža se od T1-L2. Sastoji se od preganglijskih simpatičkih neurona koji šalju impulse prema glavi, vratu, srcu i trbuhu. Također u segmentima S2-S4 sadrži preganglijske parasimpatičke neurone, koji šalju impulse u zdjelicu i trbušne organe (41-43).

Ventralni rog s pripadajućim laminama VIII i IX, najveći je u cervikalnom i lumbosakralnom segmentu koji su izvor brahijalnog i lumbosakralnog spleta. Ovi spletovi inerviraju gornje i donje udove. Lamina VIII zauzima medijalni dio ventralnog roga. Sadrži izrazito obojene živčane stanice i ima heterogen izgled. Sastoji se od interneurona i proprioceptivnih neurona koje karakterizira zrnast izgled i oblikom podsjećaju na trokut ili zvijezdu. Oni djeluju zajedno s laminom VI u refleksnom putu. U lamini VIII također završavaju vestibulospinalni i retikulospinalni putevi. Neuroni lamine VIII moduliraju motornu aktivnost, vjerojatno preko gama motornih neurona koji inerviraju intrafuzalna mišićna vlakna (41-43).

Lamina IX sastoji se od nekoliko različitih skupina velikih alfa motornih neurona i malih gama i beta motornih neurona koji su također ugrađeni u taj sloj. Aksoni velikih  $\alpha$  motornih neurona tvore ventralni korijen spinalnog živca i inerviraju ektrafuzalna skeletna mišićna vlakna i somatotopski su organizirani. Mali  $\gamma$  motorni neuroni inerviraju intrafuzalna mišićna vlakna. Lamina se može podijeliti na medijalni, lateralni i centralni dio, gdje svaki od tih dijelova inervira različiti dio muskulature (41-43).

U centralnom području moždine nalazi se lamina X koja okružuje središnji kanal. Neuroni lamine X sudjeluju u somatosenzoričkoj integraciji, visceralnoj nocicepciji, autonomnoj regulaciji i modulaciji izlaznih informacija motoneurona (41-44).

Kronična hiperglikemija narušava funkciju i rad samih neurona. U kontekstu kronične hiperglikemije, poput dijabetesa, visoke koncentracije glukoze potiču mitohondrije na proizvodnju ATP-a i prijenos elektrona. Višak glukoze se također metabolizira putem poliol puta, što dovodi do proizvodnje uznapredovalih produkata glikacije. Elektroni iz respiratornog lanca mitohondrija spajaju se kisikom i dušikovim oksidom da bi se stvorili

različiti produkti oksidativnog i nitritivnog stresa. Produkti slijedom toga aktiviraju čimbenike transkripcije, koji pojačavaju ekspresiju ionskih kanala te osim toga i umanjuju sposobnost neurona da se sami obnavljaju. Kronična hiperglikemija također povećava oksidativni stres u krvnim žilama koje dovode kisik i hranjive tvari do neuronskih vlakana. Ovaj oksidativni stres može uzrokovati mikroangiopatiju, fenomen karakteriziran oštećenjem kapilara čime je spriječena opskrba neurona (45). Zabilježene su i strukturne promjene u krvno-moždanoj barijeri dijabetičnih životinja, što je u skladu s povećanom propusnošću barijere uočenom kod osoba s dijabetesom, a sugerira da je gubitak integriteta krvno-moždane barijere također patofiziološki čimbenik utjecaja dijabetesa na SŽS (46). Uz to, hiperglikemija izazvana dijabetesom pojačava aktivaciju mikroglije, rad njene NADPH oksidaze i aktivaciju dušične sintetaze, što dovodi do oslobađanja viška slobodnih radikala u kralježničnoj moždini kod životinja s dijabetesom (45, 47).

Osim komunikacije putem sinapsi i neurotransmitera veliku ulogu u prijenosu živčanih impulsa čine i međustanični spojevi građeni od koneksina (Cx). Koneksini su izraženi u stanicama glije, uključujući astrocite, mikrogliju, oligodendrocite i Schwannove stanice, a nalaze se i u stanicama krvno-moždane barijere što je bitno za prijenos iona i propagaciju upalnog odgovora i mijelinizaciju. Koneksini također povezuju gliju i neurone i bitni su u proliferaciji neuronskih matičnih stanica (48).

U *in vitro* studijama dokazano je da je Cx36 izražen u mikrogliji u homeostatskim uvjetima, dok se Cx32 i Cx43 u mikrogliji javljaju kao odgovor na upalu (49-51). Mijelinizirajuće stanice u perifernom živčanom sustavu (Schwannove stanice) i SŽS-u (oligodendrociti) izražavaju također različite vrste koneksina. Dok Schwannove stanice primarno izražavaju Cx32, oligodendrociti izražavaju tri glavna koneksina, Cx29, Cx32 i Cx47. Astrociti su dio stanične populacije koja pokazuje najvišu razinu ekspresije koneksina u mozgu, a kao glavni se pojavljuju Cx43 i Cx30. Također, u kultiviranim astrocitima otkriveni su i Cx26, Cx30, Cx40, Cx45 i Cx46 (50). Cx36 prevladava u neuronima širom SŽS-a, s pojačanim izražajem tijekom ranog razvoja, dok su ostali koneksini, kao što su Cx30.2, Cx31.1, Cx32, Cx40, Cx45 i Cx50 također pronađeni u neuronima, ali u manjem broju slučajeva (49, 52-54).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Dosadašnja istraživanja pokazala su važnu ulogu međustanične komunikacije u patofiziologiji šećerne bolesti i njezinih komplikacija. Uzevši u obzir središnju ulogu koju koneksini imaju u međustaničnoj komunikaciji, i rezultate dosadašnjih istraživanja utjecaja šećerne bolesti na izražaj koneksina u drugim organima, naša je hipoteza da šećerna bolest uzrokuje poremećaj izražaja i lokalizacije različitih tipova koneksina u kralježničnoj moždini. Istraživanja koneksina u kralježničnoj moždini, izuzevši dobro istražen glijalni Cx43 malobrojna su i njihovi rezultati donekle su kontradiktorni, dok je u dijabetesu istražen samo Cx43.

Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi izražaj i raspored koneksina 37, 40, 43 i 45 u kralježničnoj moždini štakora te njihove eventualne promjene u kratkotrajnoj šećernoj bolesti izazvanoj aplikacijom streptozotocina.

### **3. MATERIJAL I METODE**

### **3.1. Etika**

Protokol ovog eksperimenta odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Sav eksperimentalni postupak je slijedio direktivu EU (2010/63/EU), uz dobiveno odobrenje nadležnog tijela i državnog Bioetičkog povjerenstva. Broj odobrenja: KLASA:UP/I-322-01/17- 01/12, URBROJ: 525- 10/0255-17-7.

### **3.2. Eksperimentalne životinje**

Deset muških štakora soja Sprague-Dawley, na kojima je provedeno istraživanje, imali su približno sličnu težinu oko 200 grama u početku pokusa. Bili su smješteni u kontroliranim uvjetima pri temperaturi od 22°C i gdje su se izmjenjivali ciklusi svjetla/tame svakih 12 sati u odjelu za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu. Standardiziranu laboratorijsku hranu (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i vodu štakori su konzumirali *ad libitum*.

### **3.3. Model šećerne bolesti u štakora**

Štakori su podijeljeni u dvije skupine, dijabetična (DM) i odgovarajuća kontrolna (K). Nakon cjelonoćnog gladovanja, štakorima je aplicirano intraperitonealno 55 mg/kg streptozotocina (STZ) koji je otopljen u citratnom puferu (pH 4.5) kako bi se inducirala šećerna bolest tipa 1. Štakori koji su korišteni kao kontrola dobili su čisti citratni pufer također na isti način. Razine glukoze u plazmi izmjerene su s Accu-Check glukometrom. Svi štakori s glikemijom iznad 16.5 mmol/L smatrani su dijabetičnima.

### **3.4. Priprema tkiva za bojanja**

Nakon 2 tjedna štakori su eutanizirani dekapitacijom u općoj anesteziji (Narketan®, 80 mg/kg + Xylapan®, 12 mg/kg, Vétoquinol, Bern, Švicarska). Kralježnična moždina je uklonjena i stavljena u Zambonijev fiksativ. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu (PBS), tkiva su dehidrirana u otopinama etanola rastućih koncentracija i uklopljena u parafin. Parafinski

blokovi rezani su na debljinu od 5  $\mu\text{m}$ , korištenjem mikrotoma (Leica RM2155, Pittsburgh, PA, SAD) te su potom rezovi postavljeni na predmetna stakalca. Zatim je obavljena deparafinizacija rezova tkiva u ksilenu, rehidracija u otopinama etanola padajućih koncentracija te kratko ispiranje u destiliranoj vodi. Nakon toga rezovi tkiva su zagrijani u citratnom puferu (pH 6) 15 minuta na 100° C u parnoj kupelji nakon čega je slijedilo hlađenje na sobnu temperaturu.

### **3.5. Imunohistokemija**

Nakon hlađenja rezovi su inkubirani s primarnim protutijelima u vlažnoj komori preko noći. Kao primarna protutijela korištena su slijedeća protutijela: Rabbit Anti-Cx37/GJA4 (ab181701; razrijeđena u fosfatnom puferu - PBS 1:100), Rabbit Anti-Cx40/GJA5 antibody (ab213688; 1:100), Goat Anti-connexin 43/GJA1 antibody (ab87645; 1:300), Rabbit Anti-connexin 45/GJA7/Cx45 antibody (ab135474; 1:100; sva Abcam plc. 330 Cambridge, CB4 OFL, UK) i Anti-pannexin 1/PANX1 Antibody (ABN242, Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 1:100). Rezovi su zatim isprani s PBS-om, te je na njih primijenjeno sekundarno protutijelo. Kao sekundarna protutijela korištena su magareća protu-kunićja antitijela (donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488, 711-545-152, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA) i magareća protu-kozja antitijela (Anti-Goat IgG, Alexa Fluor® 488, ab150129; Abcam plc. 330 Cambridge, CB4 OFL, UK). Potom su uzorci ponovno isprani u PBS-u pa je slijedilo bojanje jezgara s DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid) te ispiranje destiliranom vodom. Stakalca su nakon ispiranja ostavljena da se osuše na zraku pa pokrivena pokrovnim stakalcem.

### **3.6. Analiza fotografija tkiva i kvantifikacija**

Uzorci su pregledani pomoću mikroskopa BX51 (Olympus, Tokio, Japan), pri povećanju objektiva 40 puta i fotografirani digitalnom kamerom DP71 (Olympus, Tokio, Japan). Samo rezovi neoštećeni postupkom su korišteni za analizu, pa je broj analiziranih uzoraka po skupini bio 4-5. Za kvantificiranje imunoekspresije koneksina analizirani su zeleni



granularni depoziti protumačeni kao pozitivna reakcija. Obrada i analiza mikrofotografija obavljena je u programu ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Od originalnih fotografija oduzeta je matematičkim postupkom crvena komponenta fotografije (koja sadržava najviše nečistoća). Od rezultatne fotografije izoliran je filter medijana i prag je određen na 8-bitnim crno-bijelim slikama metodom „Default“. Crna površina predstavljala je imunoreaktivnost koneksina. Pomoću programa Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS., 2004, Berkeley, CA: Peachpit Press) iz obrađenih mikrofotografija izrezan je kvadrat koji pokriva površinske lamine dorzalnog roga kralježnične moždine veličine 20x20 cm ili centralni kanal, zajedno s okolnim područjem, veličine 12x12 cm (oba pri rezoluciji od 72 dpi). Na dobivenim isječcima određen je postotak površine prekrivene imunofluorescencijom, korištenjem programa ImageJ.

### **3.7. Statistička analiza podataka**

Za statističku obradu podataka korišten je program Past3 (Hammer i sur. 2001) (55). Za određivanje statističkih razlika između kontrolne i dijabetičke skupine korišten je Mann Whitney test, a za usporedbu između više različitih koneksina korišten je Kruskal-Wallis test, nakon čega je slijedio Dunn-ov post-hoc test za višestruke usporedbe. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Kao statistički značajnu razliku postavili smo  $p < 0.05$ .

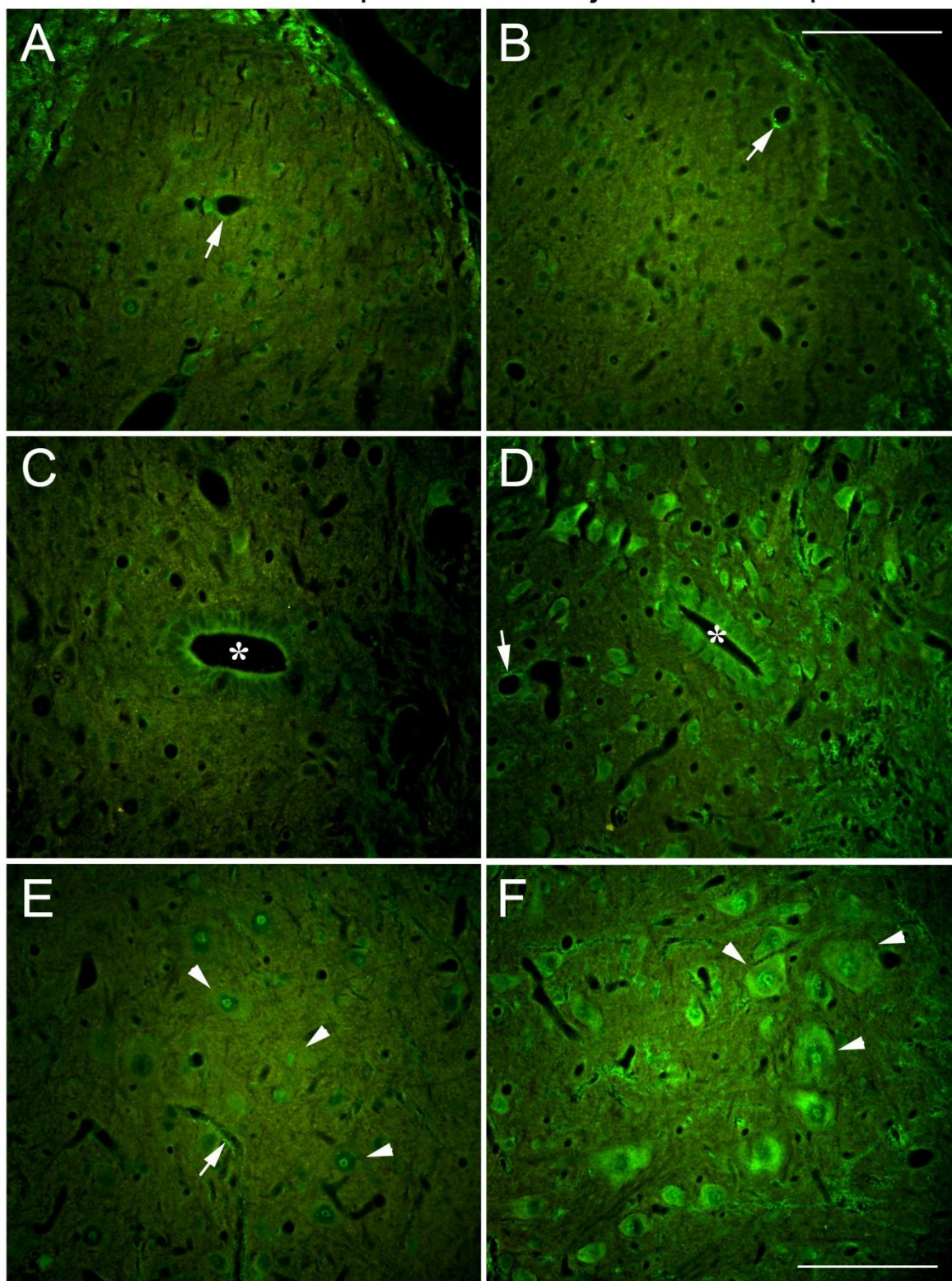
## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Promjene izražaja koneksina 37 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1**

Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora vidi se jaka imunoreaktivnost koneksina 37 u jezgrama, posebice jezgricama i citoplazmi neurona (posebno uočljiva u motornim neuronima dijabetičnih štakora), u endimskim stanicama centralnog kanala, u bijeloj tvari, kao i oko mijeliniziranih vlakana koja prolaze kroz sivu tvar, te u krvnim žilama. Jaća imunoreaktivnost koneksina 37 se uočava u skupini DM u odnosu na skupinu K (slika 1). Analizom izražaja Cx37 uočen je statistički značajan porast izražaja koneksina 37 u skupini DM u odnosu na K skupinu ( $p < 0.05$ ), ali samo u području (uključivo) centralnog kanala, dok razlika u području dorzalnog roga nije bila statistički značajna ( $p > 0.05$ ; slika 2).

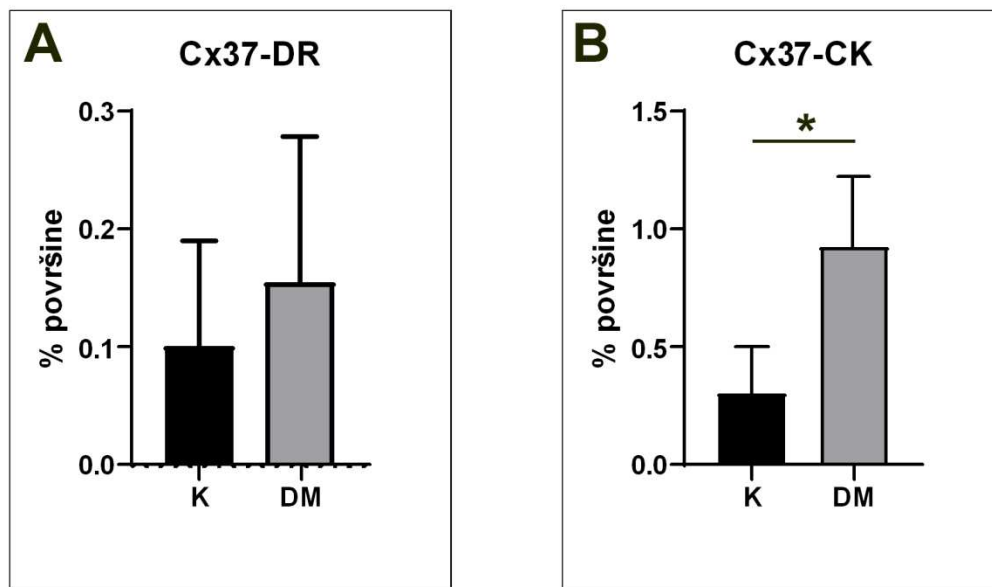
**Cx37** Kontrolna skupina

## Dijabetična skupina



**Slika 1.** Reprezentivni prikaz promjene izražaja koneksina 37 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1. Lijevo (A, C, E) se nalaze mikrofotografije histoloških rezova kralježnične moždine kontrolne skupine štakora, a desno

(B, D, F) se nalaze mikrofotografije uzoraka kralježnične moždine dijabetične skupine štakora obojanih imunofluorescencijskim bojanjem (zeleno). (A, B) dorzalni rog; (C, D) područje oko centralnog kanala; (E, F) ventralni rog. Povećanje objektiva 20x (A i B) ili 40x (C-F); \* – centralni kanal; vrh strelice – motorni neuroni u ventralnom rogu. Jaka Cx37-imunoreaktivnost prisutna je u jezgrama, posebice jezgri i citoplazmi neurona (u motornim neuronima dijabetičnih štakora), u endimskim stanicama centralnog kanala, u bijeloj tvari, kao i oko mijeliniziranih vlakana koja prolaze kroz sivu tvar, te u krvnim žilama (strelica). Mjerna skala: na B = 200 $\mu$ m (odnosi se na A i B), na F = 100 $\mu$ m (odnosi se na C-F).



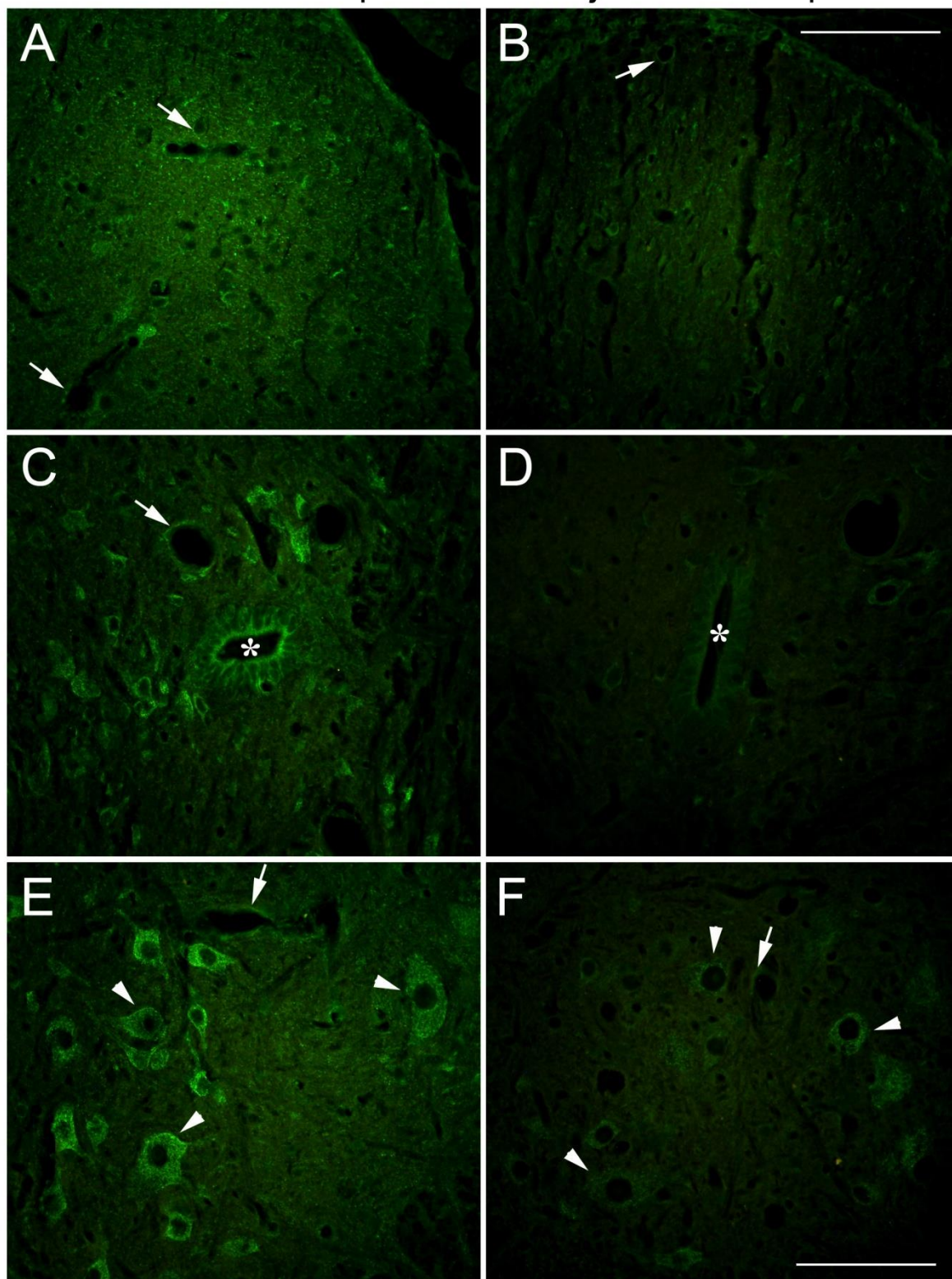
**Slika 2. Grafički prikaz promjene izražaja koneksina 37 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1. K – kontrolna skupina; DM – dijabetična skupina štakora 2 tjedna nakon i.p. aplikacije streptozotocina; CK – područje oko (uključivo) centralnog kanala, DR- dorzalni rog. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine prekrivene imunofluorescencijom. \* -  $p < 0.05$  razlika između K i DM skupine.**

#### **4.2. Promjene izražaja koneksina 40 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1**

Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora vidi se jaka imunoreaktivnost koneksina 40 u citoplazmi neurona (posebno uočljiva u motornim neuronima kontrolne skupine štakora), u endodimskim stanicama centralnog kanala te u krvnim žilama. Za razliku od Cx37, ne vidi se imunoreaktivnost Cx40 u jezgrama neurona. Slabija imunoreaktivnost koneksina 40 se uočava u skupini DM u odnosu na skupinu K (slika 3). Analizom izražaja Cx40 uočena je statistički značajno smanjenje izražaja koneksina 40 u skupini DM u odnosu na K skupinu ( $p < 0.01$ ), u području (uključivo) centralnog kanala i dorzalnog roga (slika 4).

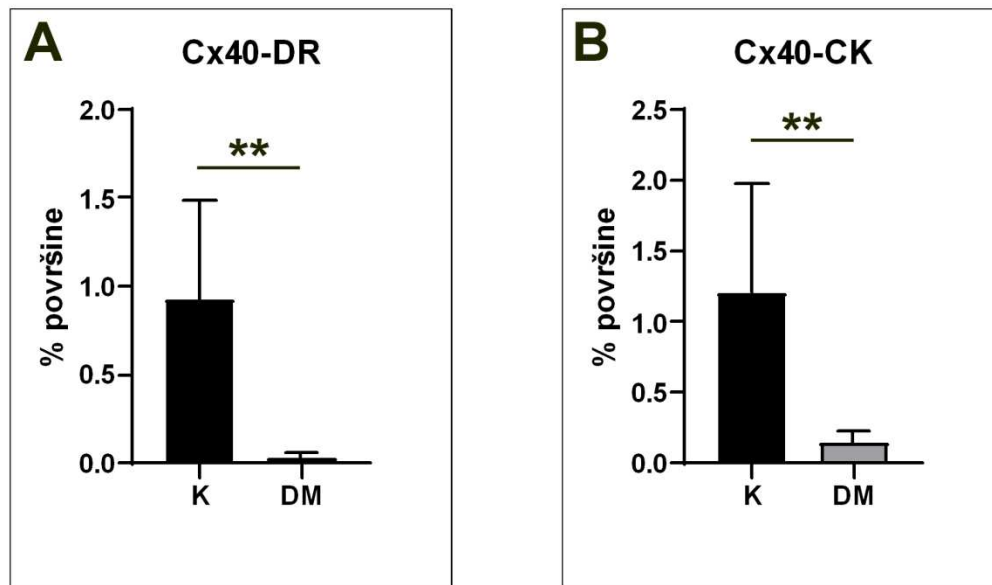
**Cx40** Kontrolna skupina

Dijabetična skupina



**Slika 3.** Reprezentativni prikaz promjene izražaja koneksina 40 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1. Lijevo (A, C, E) se nalaze

mikrofotografije histoloških rezova kralježnične moždine kontrolne skupine štakora, a desno (B, D, F) se nalaze mikrofotografije uzoraka kralježnične moždine dijabetične skupine štakora obojanih imunofluorescencijskim bojanjem (zeleno). (A, B) dorzalni rog; (C, D) područje oko centralnog kanala; (E, F) ventralni rog. Povećanje objektiva 20x (A i B) ili 40x (C-F); \* – centralni kanal; vrh strelice – motorni neuroni u ventralnom rogu. Jaka Cx40-imunoreaktivnost prisutna je u citoplazmi neurona (obje skupine štakora), u ependimskim stanicama centralnog kanala, te u krvnim žilama (strelica). Za razliku od Cx37, ne vidi se imunoreaktivnost Cx40 u jezgrama neurona. Mjerna skala: na B = 200 $\mu$ m (odnosi se na A i B), na F = 100 $\mu$ m (odnosi se na C-F).



**Slika 4. Grafički prikaz promjene izražaja koneksina 40 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1.** K – kontrolna skupina; DM – dijabetična skupina štakora 2 tjedna nakon i.p. aplikacije streptozotocina; CK – područje oko (uključivo) centralnog kanala, DR - dorzalni rog. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine prekrivene imunofluorescencijom. \*\* -  $p < 0.01$  razlika između K i DM skupine.

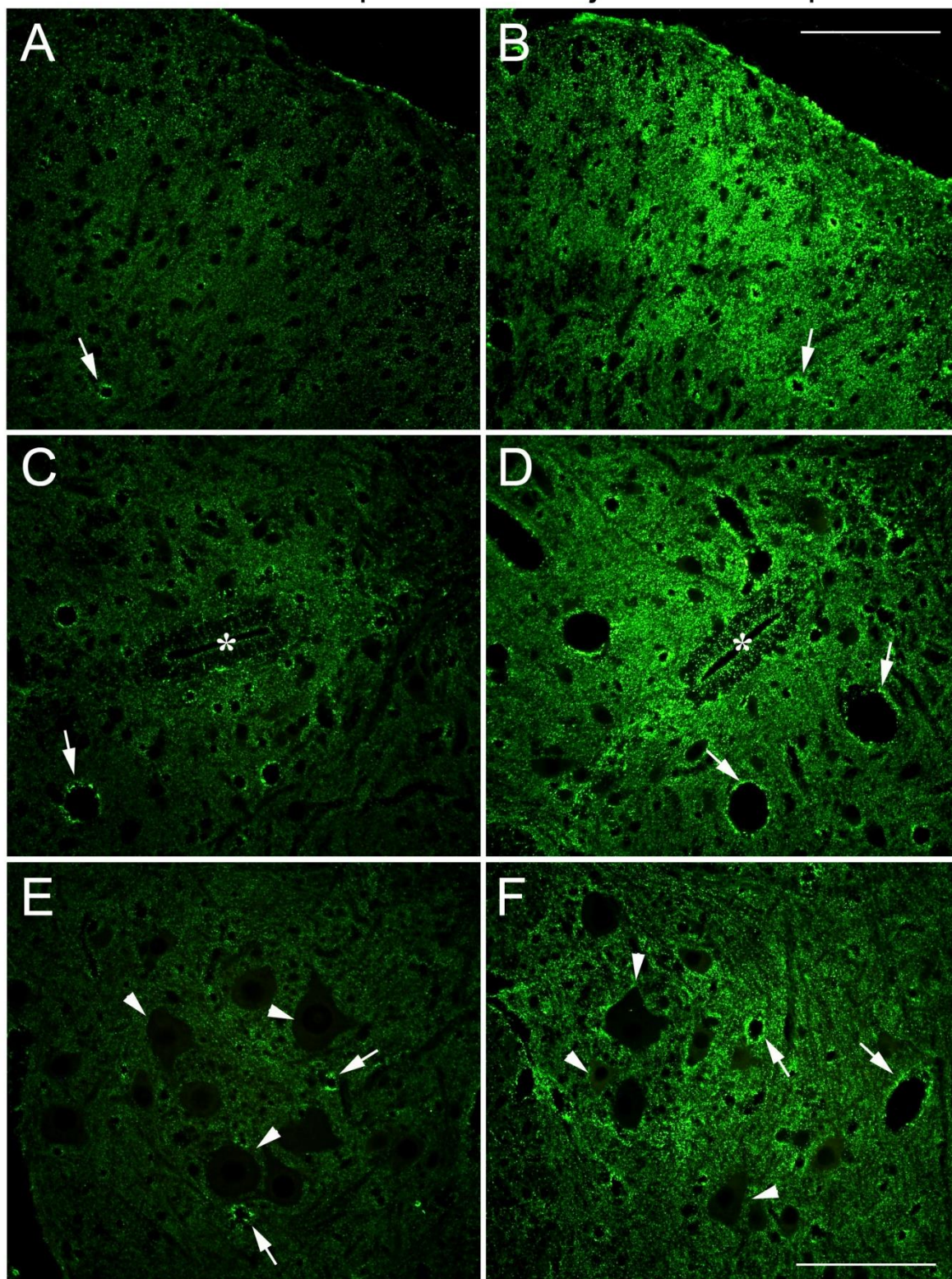


#### **4.3. Promjene izražaja koneksina 43 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1**

Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora vidi se jaka imunoreaktivnost koneksina 43 u endimskim stanicama centralnog kanala, te u krvnim žilama, kao i u sivoj tvari oko neurona (pretpostavljeno astrocitima). Za razliku od Cx37 i Cx40 ne vidi se imunoreaktivnost Cx43 u neuronima, a u bijeloj tvari je puno manje izražena u odnosu na sivu tvar. Jača imunoreaktivnost koneksina 43 se uočava u skupini DM u odnosu na skupinu K (slika 5). Analizom izražaja Cx43 uočena je statistički značajan porast izražaja koneksina 43 u skupini DM u odnosu na K skupinu ( $p < 0.05$ ), ali samo u području (uključivo) centralnog kanala, dok razlika u području dorzalnog roga nije bila statistički značajna ( $p > 0.05$ ; slika 6).

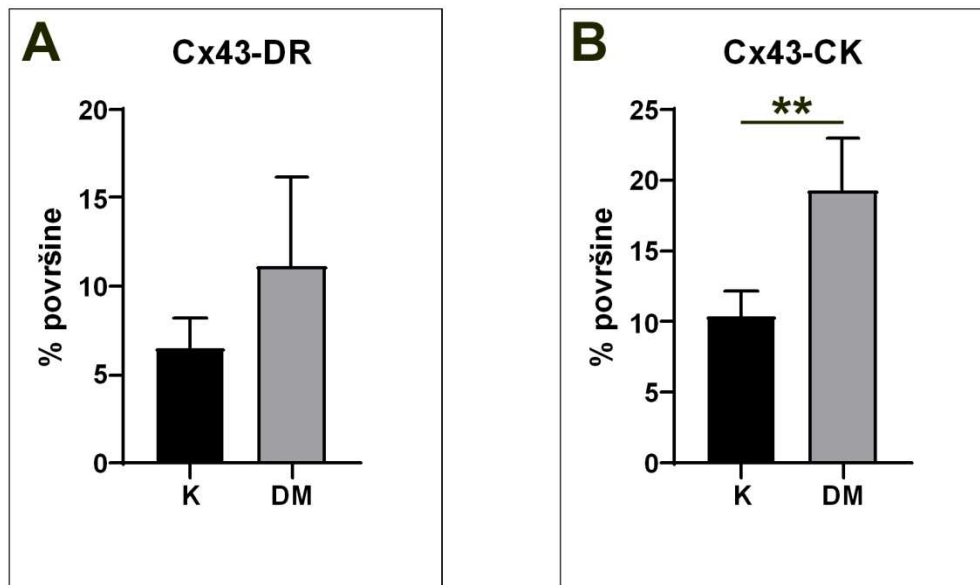
**Cx43** Kontrolna skupina

Dijabetična skupina



**Slika 5.** Reprezentativni prikaz promjene izražaja koneksina 43 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1. Lijevo (A, C, E) se nalaze mikrofotografije histoloških rezova kralježnične moždine kontrolne skupine štakora, a desno

(B, D, F) se nalaze mikrofotografije uzoraka kralježnične moždine dijabetične skupine štakora obojanih imunofluorescencijskim bojanjem (zeleno). (A, B) dorzalni rog; (C, D) područje oko centralnog kanala; (E, F) ventralni rog. Povećanje objektiva 20x (A i B) ili 40x (C-F); \* – centralni kanal; vrh strelice – motorni neuroni u ventralnom rogu. Jaka Cx43-imunoreaktivnost prisutna je u endimskim stanicama centralnog kanala, te u krvnim žilama (strelica), kao i u sivoj tvari oko neurona (pretpostavljeno astrocitima). Za razliku od Cx37 i Cx40, ne vidi se imunoreaktivnost Cx43 u neuronima, a u bijeloj tvari je puno manje izražena u odnosu na sivu tvar. Mjerna skala: na B = 200 $\mu$ m (odnosi se na A i B), na F = 100 $\mu$ m (odnosi se na C-F).



**Slika 6. Grafički prikaz promjene izražaja koneksina 43 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1.** K – kontrolna skupina; DM – dijabetična skupina štakora 2 tjedna nakon i.p. aplikacije streptozotocina; CK – područje oko (uključivo) centralnog kanala, DR - dorzalni rog. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine prekrivene imunofluorescencijom. \*\* -  $p < 0.01$  razlika između K i DM skupine.

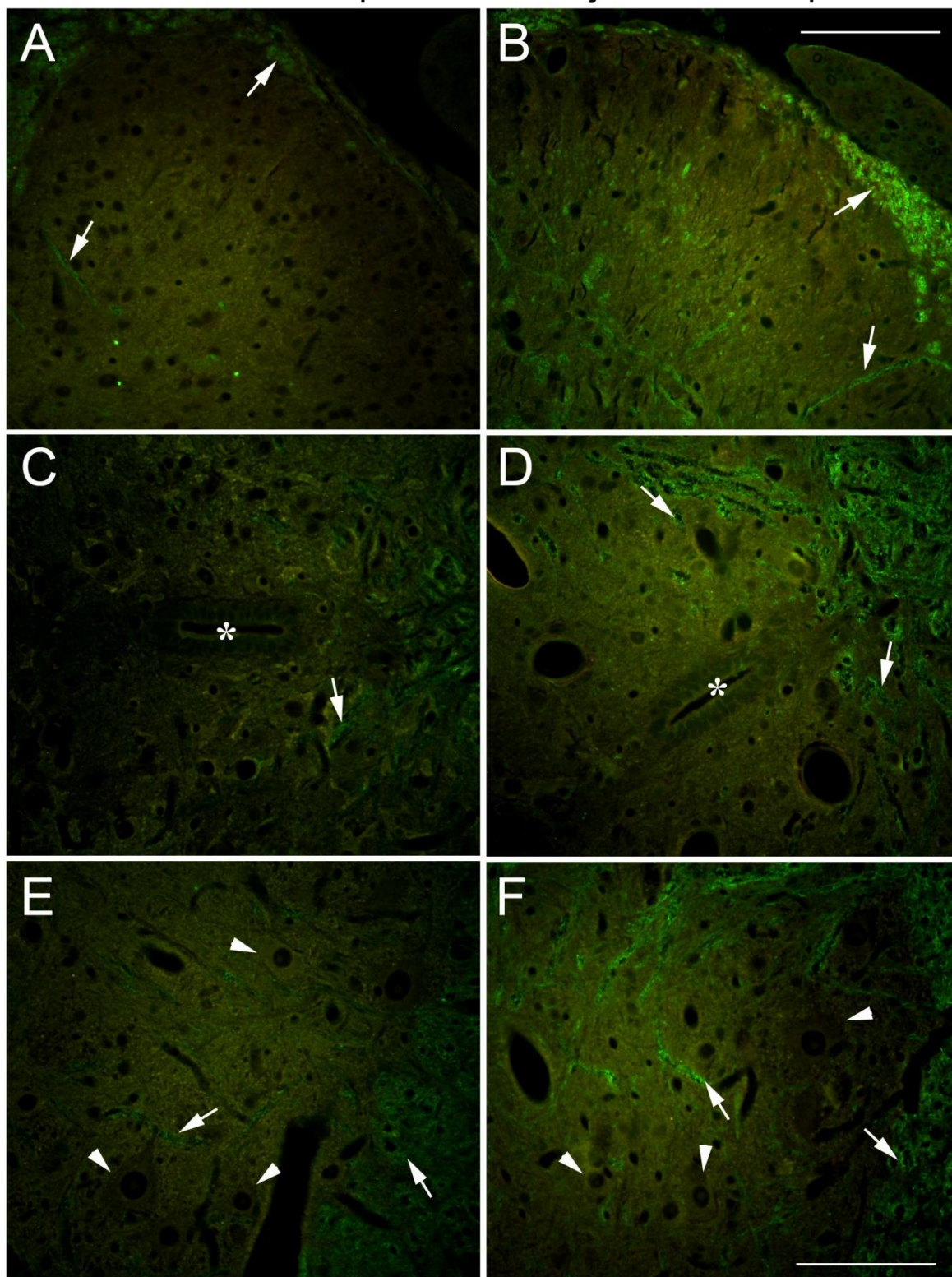
#### **4.4. Promjene izražaja koneksina 45 u kralježničnoj moždini štakora uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1**

Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora vidi se slaba imunoreaktivnost u ependimskim stanicama centralnog kanala, dok je jaka imunoreaktivnost pronađena u bijeloj tvari (strelice). Za razliku od ostalih istraživanih koneksina, Cx45-imunoreaktivnost nije pronađena u neuronima i sivoj tvari općenito, s izuzetkom jake imunoreaktivnosti oko mijeliniziranih aksona koji prolaze kroz sivu tvar (slika 7). Analizom izražaja Cx45 nisu uočene statistički značajne razlike izražaja koneksina 45 u kralježničnoj moždini između kontrolne i dijabetične skupine štakora ( $p > 0.05$ ; slika 8).

Za razliku od ostalih istraživanih koneksina, Cx45-imunoreaktivnost nije pronađena u neuronima i sivoj tvari općenito, s izuzetkom jake imunoreaktivnosti oko mijeliniziranih aksona koji prolaze kroz sivu tvar (strelice). Slaba imunoreaktivnost prisutna je u ependimskim stanicama centralnog kanala, dok je jaka imunoreaktivnost pronađena u bijeloj tvari (strelice).

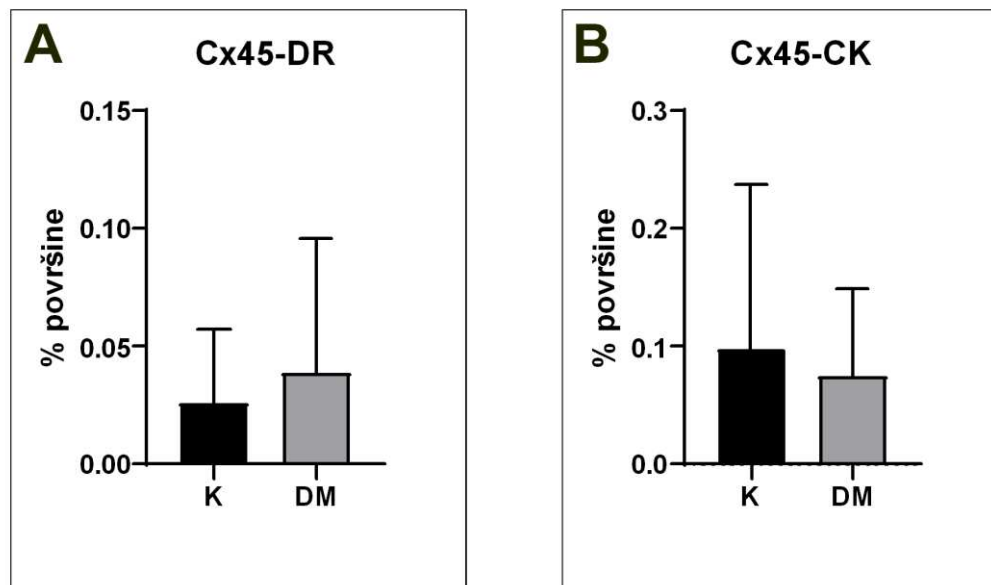
**Cx45** Kontrolna skupina

## Dijabetična skupina



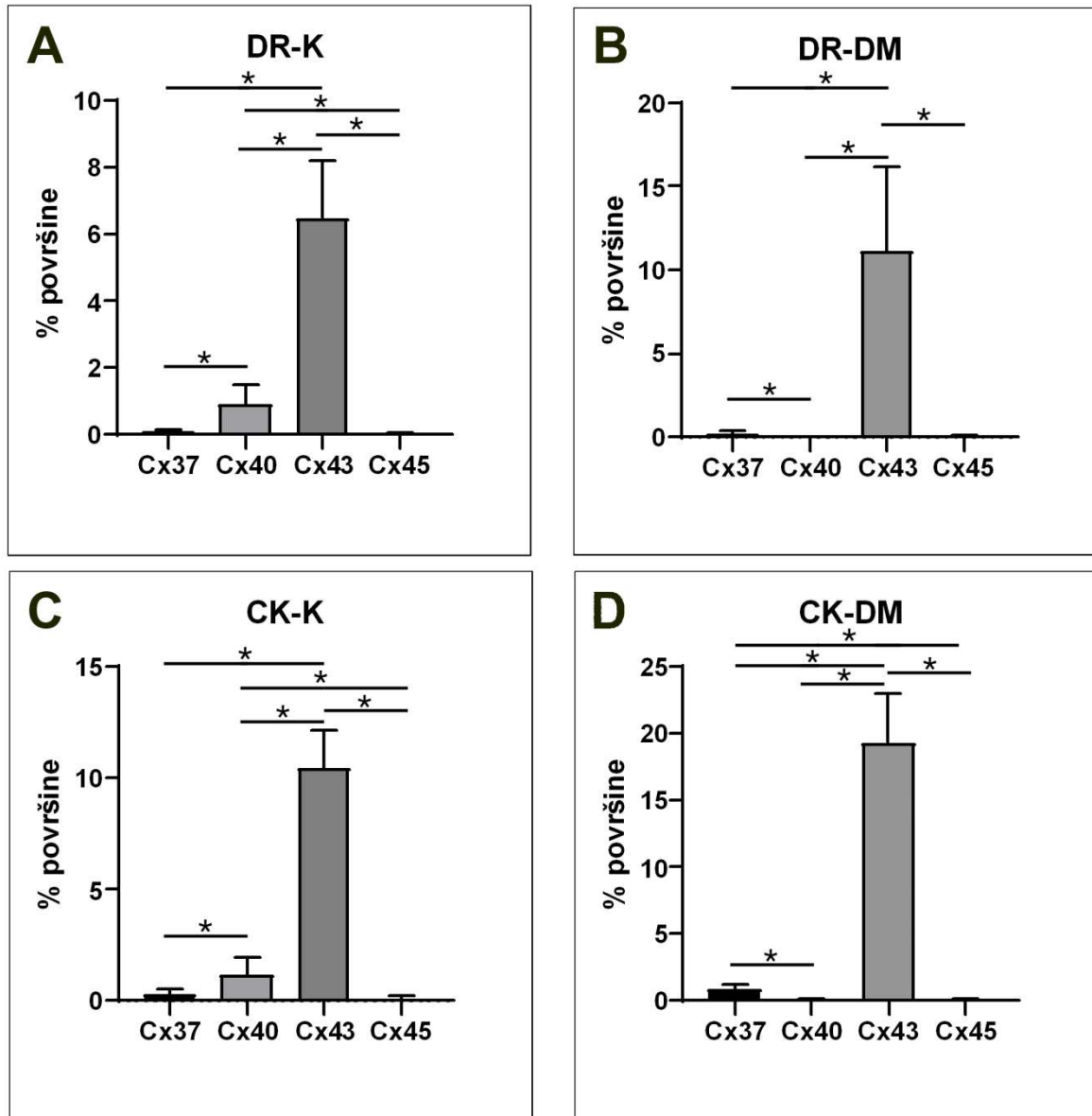
**Slika 7.** Reprezentivni prikaz promjene izražaja koneksina 45 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1. Lijevo (A, C, E) se nalaze mikrofotografije histoloških rezova kralježnične moždine kontrolne skupine štakora, a desno

(B, D, F) se nalaze mikrofotografije uzoraka kralježnične moždine dijabetične skupine štakora obojanih imunofluorescencijskim bojanjem (zeleno). (A, B) dorzalni rog; (C, D) područje oko centralnog kanala; (E, F) ventralni rog. Povećanje objektiva 20x (A i B) ili 40x (C-F); \* – centralni kanal; vrh strelice – motorni neuroni u ventralnom rogu. Za razliku od ostalih istraživanih koneksina, Cx45-imunoreaktivnost nije pronađena u neuronima i sivoj tvari općenito, s izuzetkom jake imunoreaktivnosti oko mijeliniziranih aksona koji prolaze kroz sivu tvar (strelice). Slaba imunoreaktivnost prisutna je u ependimskim stanicama centralnog kanala, dok je jaka imunoreaktivnost pronađena u bijeloj tvari (strelice). Mjerna skala: na B = 200 $\mu$ m (odnosi se na A i B), na F = 100 $\mu$ m (odnosi se na C-F).



**Slika 8. Grafički prikaz promjene izražaja koneksina 45 u kralježničnoj moždini uzrokovane kratkotrajnom šećernom bolešću tipa 1. K – kontrolna skupina; DM – dijabetična skupina štakora 2 tjedna nakon i.p. aplikacije streptozotocina; CK – područje oko (uključivo) centralnog kanala, DR - dorzalni rog. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine prekrivene imunofluorescencijom.**

4.5. Usporedba izražaja različitih tipova koneksina u kralježničnoj moždini kontrolnih i dijabetičnih štakora



**Slika 9.** Grafički prikaz usporedbe izražaja koneksina 37, 40, 43 i 45 u kralježničnoj moždini štakora. K – kontrolna skupina; DM – dijabetična skupina štakora 2 tjedna nakon i.p. aplikacije streptozotocina; CK – područje oko (uključivo) centralnog kanala, DR - dorzalni rog. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine prekrivene imunofluorescencijom. \* -  $p < 0.05$  razlika između označenih koneksina.

Usporedbom izražaja pojedinih koneksina, utvrdili smo da je u istraživanim područjima kralježnične moždine štakora najviše izražen Cx43, značajno više u odnosu na sve ostale istraživane koneksine, kako u kontrolnoj, tako i u dijabetičnoj skupini štakora (slika 9; sve razlike  $p < 0.05$ ). Izražaj Cx40 značajno je veći u odnosu na izražaj Cx45 u kontrolnoj skupini (i u dorzalnog rogu i oko centralnog kanala) (sve razlike  $p < 0.05$ ), no nakon njegovog smanjenja u dijabetičnoj skupini, ova razlika se više ne može uočiti. Međutim, izražaj Cx37 značajno je manji u usporedbi s izražajem Cx40 u kontrolnih štakora (u oba istraživana područja kralježnične moždine), ali nakon pada izražaja Cx40 u dijabetičnih štakora, izražaj Cx37 veći je u odnosu na izražaj Cx40 (sve razlike  $p < 0.05$ ). Najmanje su u kralježničnoj moždini štakora izraženi Cx37 i Cx45, pri čemu je izražaj Cx45 značajno manji u usporedbi s Cx37 jedino u dijabetičnih štakora u području oko centralnog kanala ( $p < 0.05$ ).



## **5. RASPRAVA**

U ovom eksperimentu istražili smo izražaj koneksina u kralježničnoj moždini dijabetičnih štakora 2 tjedna nakon što smo im inducirali šećernu bolest injekcijom streptozotocina otopljenom u citratnom puferu. Istraživanjem koneksina odnosno međustaničnih spojeva htjeli smo utvrditi važnost utjecaja kratkotrajnog dijabetesa na međustaničnu komunikaciju u kralježničnoj moždini te njihovu povezanost s komplikacijama dijabetesa. U dosadašnjoj literaturi pronašli smo istraživanja koja navode promjene u izražaju nekih tipova koneksina pri utjecaju hiperglikemije u kralježničnoj moždini, a i u drugim tkivima, kao što su bubrezi, srce, jetra, koža i drugi. Pri tome valja napomenuti da su istraživanja koneksina u kralježničnoj moždini, ako izuzmemo dobro istražen glijalni Cx43, malobrojna i rezultati nisu uvijek u suglasju, dok je u dijabetesu u kralježničnoj moždini istražen samo Cx43. Stoga nam je cilj bio utvrditi raspored i izražaj koneksina 37, 40, 43 i 45 u kralježničnoj moždini štakora te njihove eventualne promjene u kratkotrajnoj šećernoj bolesti izazvanoj aplikacijom streptozotocina u štakora.

Limitacije ovog istraživanja su relativno mali uzorak (4-5 životinja po skupini) te da smo koristili samo imunohistokemiju, a ne druge metode, primjerice Western blot za određivanje izražaja koneksina. Međutim, prednost imunohistokemije kao metode je da se može pratiti izražaj ciljanog proteina u različitim dijelovima kralježnične moždine (dorzalni rog, centralni kanal itd) i različitim populacijama stanica, primjerice motorni neuroni, dok Western blot takvu analizu ne omogućuje.

Tijekom našeg istraživanja utvrdili smo izražaj Cx37 u neuronima kralježnične moždine. Jaka imunoreaktivnost Cx37 nađena je u jezgrama, posebice jezgricama, ali i u citoplazmi neurona, što je posebno uočljivo u motornim neuronima dijabetičnih štakora. Izražaj Cx37 također smo utvrdili u endimskim stanicama centralnog kanala, u bijeloj tvari, kao i oko mijeliniziranih vlakana koja prolaze kroz sivu tvar, te u krvnim žilama. Pretragom literature našli smo samo tri rada koja spominju izražaj Cx37 u kralježničnoj moždini. Lin i suradnici (2002) izvijestili su o prisutnosti Cx37 mRNA u lumbalnom segmentu kralježnične moždine štakora, međutim ne spominju nikakve detalje o lokalizaciji ovog koneksina na staničnoj razini (56). Lavrov i suradnici (2016) pronašli su sporadičnu imunoreaktivnost Cx37 u kralježničnoj moždini aksolotla (*Necturus Maculatus*), međutim, također ne opisuju niti prikazuju detalje ovog nalaza, budući da je i u njihovom, slično kao i u našem istraživanju, u moždini Cx43 bio dominantan (57). Nadalje, Chang i sur. (1999) utvrdili su jak izražaj različitih tipova koneksina (uključujući sve koje smo obuhvatili našim istraživanjem) u kralježničnoj moždini štakora tijekom embrionalnog razdoblja, koji se smanjio prema kraju

intrauterinog razvoja, ali se nakon toga zadržao i u adultnom razdoblju. Izražaj Cx37 zadržao se u velikom postotku motornih neurona odraslih štakora (58). Nalaz Cx37 u krvnim žilama kraljeznične moždine u suglasju je s njegovom dosada već opisanom redovitom pojavom u krvnim žilama, većinom u endotelu žila i u monocitima/makrofazima, pri čemu je i dobro opisana njegova uloga u stvaranju aterosklerotskog plaka (59).

Analizom imunoreaktivnosti uočili smo značajan porast izražaja Cx37 u štakora dva tjedna nakon indukcije DM1, ali je razlika dosegla razinu značajnosti samo u području (uključivo) centralnog kanala, dok razlika u području dorzalnog roga nije dosegla razinu statističke značajnosti (slika 2). Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje porast izražaja koneksina 37 u kraljezničnoj moždini izazvan dijabetesom. Donekle u suprotnosti s našim rezultatima, studije koje opisuju promjenu izražaja Cx37 u drugim organima tijekom dijabetesa ukazuju na smanjeni izražaj u srcu *db/db* miševa u usporedbi s divljim tipom (60), pad izražaja u bubrežnim stanicama koje proizvode renin u Zuckerovom modelu dijabetičnih pretilih štakora (model DM2) (61) te pad izražaja Cx37 mRNA u oocitama dijabetičnih miševa (62). Donekle u suglasju s našim rezultatima su rezultati istraživanja, Lin i sur. (2002), na modelu neuropatske boli u štakora gdje je utvrđen porast izražaja Cx37 u proksimalnom i distalnom okrajku ishijadičnog živca nakon ozljede, koji je bio proporcionalan stupnju termalne hiperalgezije. Međutim, u istom istraživanju nije utvrđen porast izražaja Cx37 u lumbalnom segmentu kraljeznične moždine (56). S obzirom na jasnu poveznicu porasta izražaja Cx37 s hiperekscitabilnošću nakon ozljede perifernog živca, mogla bi se oprezno povući paralela s potencijalnom ulogom porasta izražaja Cx37 u centralnoj hiperekscitabilnosti neurona kraljeznične moždine u šećernoj bolesti tipa 1.

Za razliku od ostalih istraživanih koneksina, imunoreaktivnost Cx37 pronašli smo i u jezgrama neurona, a posebice jaka imunoreaktivnost utvrđena je u jezgricama (slika 1). Iako je, kako je u uvodu opisano, uloga i izražaj koneksina prvenstveno vezan uz staničnu membranu (30), zbog kratkog poluživota koneksina i brze dinamike njihove stalne sinteze i razgradnje, izražaj koneksina uobičajeno je naći u citoplazmi, fiziološki, ali i u nekim patološkim stanjima kao što su karcinomi (Cx26, Cx30, Cx43) (63-65). Nadalje, izražaj u jezgri spominje se za Cx43 i Cx30 također i u progenitorskim stanicama dobivenim kultivacijom ependimskih stanica centralnog kanala kraljeznične moždine (66). Sugerira se da se pojava koneksina u jezgri može povezati s regulacijom genskog izražaja vezano uz kontrolu rasta i diferencijacije, mehanizmima neovisnim o međustaničnoj komunikaciji (63, 64, 66-68).

Našim istraživanjem utvrdili smo izražaj Cx40 u neuronima kralježnične moždine. Jaka imunoreaktivnost Cx40 uočena je u citoplazmi neurona (posebno uočljiva u motornim neuronima dijabetičnih štakora), u ependimskim stanicama centralnog kanala, u bijeloj tvari, te u krvnim žilama. Za razliku od Cx37, nismo uočili imunoreaktivnost Cx40 u jezgrama neurona (slika 3). U spomenutom istraživanju Changa i sur. (1999) također je utvrđen jak izražaj Cx40 u neuronima štakora tijekom embrionalnog razdoblja, koji je u adultnom razdoblju smanjen na oko 7% pozitivnih motornih neurona (58) što nije u suglasju s rezultatima našeg istraživanja u kojem smo utvrdili jaku imunoreaktivnost Cx40 u svim promatranim motornim neuronima, kao i brojnim drugim neuronima u kralježničnoj moždini. Obrazac imunoreaktivnosti bio je sličan onome utvrđenom u našem istraživanju, s točkastim citoplazmatskim i membranskim bojanjem. Razlike u nalazu mogu se objasniti različitim tehnikama, budući da su Chang i sur. za kvantifikaciju koristili *in situ* hibridizaciju; kao i potencijalno većom osjetljivošću protutijela koja smo koristili. Ista grupa istraživača, Personius i sur. (2007), koristeći model Cx40 knock-out miša, utvrdila je da je sprega putem međustaničnih spojeva (koji sadrže Cx40) nužna za održavanje obrasca aktivnosti motornih neurona koji posreduju oblikovanju neuromuskularnih sinapsi (69). Analizom izražaja Cx40 uočili smo značajno smanjenje izražaja Cx40 u dijabetičnih, u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora, kako u području (uključivo) centralnog kanala, tako i dorzalnog roga (slika 4). Navedeno se može objasniti djelovanjem hiperglikemije na mitohondrije i organele u stanicama, koje se očituje nastankom slobodnih radikala i oksidativnog stresa s posljedičnim smanjenjem sinteze i ugradnje Cx40 u membranu. Stanice koje izražavaju Cx40 i koje su se pokazale osjetljive na visoku glikemiju su neuroni i astrociti te stanice endotela (36, 49, 50). Makino i suradnici (2008) pokazali su da je hiperglikemija uzrokovala smanjenje izražaja proteina Cx40 u endotelu koronarnih žila i također umanjila stvaranje endotelne kapilarne mreže. Nadalje, povezali su smanjenje izražaja Cx40, uzrokovano hiperglikemijom, s inhibiranim izražajem transkripcijskog čimbenika koji regulira izražaj Cx40 (70). Ovi podaci sugeriraju da smanjivanje izražaja proteina Cx40 i rezultirajuća patološka komunikacija među stanicama mogu doprinijeti neadekvatnoj sprezi astrocita i neurona, i vaskularnoj disfunkciji u SŽS-u kod dijabetesa.

Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora uočili smo jaku imunoreaktivnost Cx43 u ependimskim stanicama centralnog kanala, te u krvnim žilama, kao i u sivoj tvari oko neurona (pretpostavljeno astrocitima i mikrogliji). Za razliku od Cx37 i Cx40 nismo pronašli imunoreaktivnost Cx43 u neuronima, a u bijeloj tvari je

imunoreaktivnost puno manje izražena u odnosu na sivu tvar (slika 5). Navedeno je u suglasju s navodima Lapata i Tiwari-Woodruffa (2018) da se Cx43 u kralježničnoj moždini pretežno nalazi u mikrogliji i astrocitima i bitan je za njihovu interakciju i prijenos iona (49). Suprotno našem nalazu, neki autori spominju izražaj Cx43 također i u neuronima kralježnične moždine. Spomenutim istraživanjem Changa i sur. (1999) utvrđen je jak izražaj Cx43 u neuronima štakora tijekom embrionalnog razdoblja, koji je u adultnom razdoblju očuvan s oko 93% motornih neurona pozitivnih na Cx43 mRNA (58). Obrazac Cx43 imunoreaktivnosti bio je sličan onome utvrđenom u našem istraživanju, s izuzetno rijetkim točkastim citoplazmatskim i membranskim bojanjem, koje u našem istraživanju nismo interpretirali kao pozitivan nalaz. Nadalje, Lavrov i suradnici (2016) također opisuju dominantnu imunoreaktivnost Cx43 u kralježničnoj moždini aksolotla (*Necturus Maculatus*), ali u gliji i neuronima te ukazuju na njegovu ulogu u motornim neuronskim krugovima odgovornima za generiranje aktivnosti slične hodu (57).

Usporedbom izražaja pojedinih koneksina, utvrdili smo da je u istraživanim područjima kralježnične moždine štakora najviše izražen Cx43, značajno više u odnosu na sve ostale istraživane koneksine, kako u kontrolnoj, tako i u dijabetičnoj skupini štakora; nakon čega slijedi izražaj Cx40, a najmanje su u kralježničnoj moždini štakora zastupljeni Cx37 i Cx45 (slika 9). Ovakav nalaz u suglasju je s većinom dosadašnjih istraživanja, koja ukazuju na dominantnu prisutnost Cx43, kako u kralježničnoj moždini, tako i u drugim tkivima (30, 71).

Jača imunoreaktivnost Cx43 se uočava u moždinama dijabetičnih štakora (slika 5). Analizom izražaja Cx43 uočen je značajan porast 2 tjedna nakon indukcije DM1, ali samo u području oko (uključivo) centralnog kanala, dok razlika u području dorzalnog roga nije dosegla razinu statističke značajnosti (slika 6). Iako ne izravno usporedivo, ovakav nalaz u suglasju je s brojnim istraživanjima koja ukazuju na porast izražaja Cx43 u astrocitima i mikrogliji tijekom različitih upalnih stanja u kralježničnoj moždini (autoimune bolesti, multipla skleroza, Alzheimerova bolest), poslije moždanog udara, zatim u akutnoj i kroničnoj fazi nakon ozljede kralježnične moždine (28). Primarne lezije nakon ozljede leđne moždine, ishemije mozga i ozljede perifernog živca djeluju izravno na lokalne astrocite i potiču interakciju između aktivirane mikroglije i astrocita, dovodeći do povećanja izvanstanične koncentracije  $Ca^{2+}$ . ATP i citokini koji se oslobađaju putem hemikanala koji sadrže Cx43 u astrocitu djeluju na mikrogliju putem P2X receptora, čime se dalje pokreće aktivacija astrocita i otvaranje još većeg broja Cx43-hemikanala. ATP, glutamat,  $NAD^+$  i citokini koje oslobađa

Cx43 izravno moduliraju prijenos impulsa među stanicama i pokreću upalnu kaskadu, što na kraju rezultira kroničnom boli, degeneracijom neurona i nepovratnim oštećenjima živčanog tkiva (72).

Slično rezultatima našeg istraživanja na kralježničnoj moždini, Guang-Yu Wang i suradnici (2017) utvrdili su da hiperglikemija izaziva povišeni izražaj Cx43 u kardiomiocitima ventrikula koji imaju važnu ulogu u održavanju normalne srčane funkcije, kao što su metabolički procesi i pravilna električna vodljivost. Stoga su promjene izražaja Cx43 povezane s različitim srčanim bolestima, kao što su infarkt miokarda, ishemija-reperfuzija, aritmija i zatajenje srca (73). Ball KK i sur. (2011) uzgajali su astrocite mozga štakora u mediju s visokom (25 mmol/L) i niskom (5,5 mmol/L) razinom glukoze u trajanju od 2 do 3 tjedna te pratili izražaj Cx43. Njihovo istraživanje pokazalo je pad izražaja Cx43 u navedenim stanicama, ali i u donjem kolikulu dijabetičnih štakora, što objašnjavaju utjecajem oksidativnog i nitritivnog stresa (74). Također Gandhi i sur. (2010) prikazuju smanjenu ekspresiju Cx43 (i Cx30, ali ne Cx26) u astrocitima, pri izlaganju hiperglikemiji, čime objašnjavaju i utvrđeno smanjenje međustanične komunikacije u kultiviranim astrocitima, ali i u donjem kolikulu štakora 20-24 tjedna nakon indukcije DM1 streptozotocinom – pri čemu ne prikazuju promjene u izražaju koneksina u mozgu, samo u astrocitima u kulturi (75). Rezultati obaju navedenih istraživanja u suprotnosti su s našima. Navedena razlika može se objasniti prvenstveno u različitim dijelovima SŽS koje smo istraživali (za koju sami autori utvrđuju razlike u promjenama kod dijabetičnih štakora); u duljini trajanja dijabetesa, koji je u našem istraživanju u početnoj fazi; kao i da se *in vitro* kultivacijom izoliranih astrocita izostavlja međusobna interakcija različitih populacija stanica koja bi mogla utjecati na izražaj koneksina.

Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora ustvrdili smo slabu imunoreaktivnost Cx45 u ependimskim stanicama centralnog kanala, dok je jaka imunoreaktivnost pronađena u bijeloj tvari. Za razliku od ostalih istraživanih koneksina, Cx45 imunoreaktivnost nije pronađena u neuronima i sivoj tvari općenito, s izuzetkom jake imunoreaktivnosti oko mijeliniziranih aksona koji prolaze kroz sivu tvar (slika 7). U suprotnosti s našim rezultatima, u istraživanju Chapman i sur. (2013) korištenjem Cx45 reportera mišjeg modela utvrđena je lokalizirana ekspresija Cx45 u interneuronima unutar lamina I-III dorzalnog roga kralježnične moždine, sa zaključkom da dorzalni rog izražava Cx45 koji pod određenim uvjetima sudjeluje u ostvarivanju neuronalno-glijalne mreže i relevantan je za somatosenzorni put i nocicepciju (76). Osim lokalizacije u neuronima, Cx45

pronađen je i u mikrogliji i oligodendrocitima (77, 78). U suglasju s našim rezultatima, Pastor i sur. (1998) i Dermietzel i sur. (1997) utvrdili su prisutnost Cx45 proteina i mRNA u oligodendrocitima, tako da možemo pretpostaviti da je većina Cx45 imunoreaktivnosti koju nalazimo oko vlakana i u bijeloj tvari lokalizirana upravo u oligodendrocitima (79, 80). Međutim, zanimljivo je da su utvrđene različite uloge Cx45 u oligodendrocitima koji se mogu naći u sivoj tvari, gdje Cx45 služe međusobnom povezivanju stanica, za razliku od bijele tvari, gdje je nađen vrlo niski stupanj međusobnog povezivanja stanica pa se pretpostavlja da oni ovdje imaju potpuno drugačiju ulogu.

Analizom imunoreaktivnosti Cx45 nismo uočili razlike izražaja Cx45 u kralježničnoj moždini između kontrolne i dijabetične skupine štakora (slika 8). Izražaj Cx45 u kralježničnoj moždini tijekom šećerne bolesti do sada nije istraživan pa je naše istraživanje prvo takve vrste. Utjecaj hiperglikemije na Cx45 objašnjen je u eksperimentu Howartha i sur. (2007) gdje su ispitivani učinci dijabetesa na električnu aktivnost srca, i to sinoatrijskog čvora. Sinusna aritmija, koja se javila kao posljedica indukcije dijabetesa melitusa, uzrokovana je izmjenom funkcije sinoatrijskog čvora zbog povišenog izražaja Cx45 (81).

Važan nalaz naše studije je naglašena imunoreaktivnost svih istraživanih koneksina u endimskim stanicama centralnog kanala kralježnične moždine, koja je bila proporcionalna onoj u drugim područjima, pa je tako najviši bio izražaj Cx43, a najniži Cx45. Ependim centralnog kanala kralježnične moždine, prema radu Fabbiani i sur. (2020), latentni je izvor matičnih stanica, koji se reaktivira nakon ozljede kralježnične moždine te postaje izvor novih stanica za glijalni „ožiljak“ (82). Poznato je da su ove stanice povezane međusobno pukotinskim spojevima, te se smatra da pukotinski spojevi i hemikanali koje tvore koneksini igraju važnu ulogu u reaktivaciji proliferacije, pri čemu se posebno ističu Cx26 i Cx43 (82). Rodriguez-Jimenez i sur. (2015) opisali su da progenitorske stanice dobivene kultivacijom endimskih stanica iz adultne kralježnične moždine pokazuju visoku razinu izražaja Cx50 u fiziološkim uvjetima te da se ova razina smanjuje nakon ozljede kralježnične moždine (66). Nadalje, dokazali su da su ovi učinci Cx50 barem djelomično posljedica moduliranja izražaja Sox2, čimbenika ključnog za održavanje samo-obnavljanja pluripotentnosti neuralnih matičnih stanica i *in situ* konverziju endogenih glija stanica u neurone (83). Russo i sur. (2008) dokazali su važnost funkcije Cx43 u endimskim stanicama kralježnične moždine za neurogenezu (84). Osvrćući se na rastući broj istraživanja koji dokazuju važnost uloge različitih tipova koneksina u procesima samoobnavljanja, rasta, proliferacije i diferencijacije matičnih stanica Rodriguez-Jimenez i sur. (2016) zaključuju o visokom potencijalu

modulacije koneksina u budućnosti regenerativne terapije kralježnične moždine (detaljan opis s popisom literature u Rodriguez-Jimenez i sur., 2016). Uzevši u obzir sve navedeno, naši rezultati podupiru značaj svih istraženih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) u funkciji endodimskih stanica centralnog kanala, vjerojatno proporcionalno njihovom izražaju. Nadalje, porast izražaja Cx37 i Cx43, kao i pad izražaja Cx40, koje smo utvrdili u području oko (uključivo) centralnog kanala kralježnične moždine dijabetičnih štakora mogao bi ukazivati na poremećeni potencijal endodimskih stanica centralnog kanala u regeneraciji kralježnične moždine nakon potencijalne ozljede u pacijenata oboljelih od šećerne bolesti. Zbog širokog raspona različitih uloga koje se pripisuju neuronima lamine X kralježnične moždine, ove promjene također bi mogle imati značajnu ulogu u procesima maladaptacije viscerosenzornih puteva izazvanim dijabetesom.

Uzevši u obzir izražaj i promjene različitih istraženih koneksina koje smo utvrdili u štakora oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 izazvane streptozotocinom u površinskim laminama dorzalnog roga, posebice naglašeni pad razine Cx40, čiji smo izražaj utvrdili prvenstveno u neuronima, također možemo zaključiti o njihovoj ulozi u procesima maladaptacije somatosenzornih puteva izazvanim dijabetesom.



## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Koneksin 37 i Cx40 su u kralježničnoj moždini štakora prvenstveno izraženi u neuronima, dok je Cx43 prvenstveno izražen u astrocitima i mikrogliji, a Cx45 u oligodendrogliji.
2. Eksperimentalni DM1 u štakora u početnoj fazi uzrokuje poremećaj izražaja različitih tipova koneksina.
3. Izražaj Cx40 se u početnoj fazi DM1 smanjuje, kako u području oko (uključivo) centralnog kanala, tako i dorzalnog rogu.
4. Izražaj Cx43 i Cx37 raste u početnoj fazi DM1 u području oko (uključivo) centralnog kanala.
5. Promjene izražaja koneksina koje smo utvrdili u kralježničnoj moždini dijabetičnih štakora u području oko centralnog kanala mogle bi imati značajnu ulogu u procesima maladaptacije viscerosenzornih puteva izazvanim dijabetesom i utjecati na reaktivnost moždine na potencijalnu ozljedu.
6. Promjene izražaja koneksina koje smo utvrdili u dorzalnog rogu kralježnične moždine dijabetičnih štakora mogle bi imati značajnu ulogu u procesima maladaptacije somatosenzornih puteva izazvanim dijabetesom.

## **7. POPIS LITERATURE**

1. Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee, Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes*. 2018;42(Suppl 1):S10–5.
2. Deshmukh CD, Jain A, Nahata B. Diabetes Mellitus: A Review. *Int J Pure Appl Biosci*. 2015;3:224–30.
3. IDF diabetes atlas - 9th edition [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2019 [citirano 16. travnja 2020]. Dostupno na: <http://www.diabetesatlas.org/>
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020; 43(Suppl 1):S14–31.
5. Type 1 Diabetes Mellitus Treatment & Management [Internet]. Medscape; 2020 [citirano 17. travnja 2020]. Dostupno na <https://www.medscape.com/>
6. Type 2 diabetes [Internet]. Mayo Clinic [citirano 17. travnja 2020]. Dostupno na <https://www.mayoclinic.org/>
7. Simmons KM, Michels AW. Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J Diabetes*. 2015;6(3):380–90.
8. Petzold A, Solimena M, Knoch KP. Mechanisms of Beta Cell Dysfunction Associated With Viral Infection. *Curr Diab Rep*. 2015;15(10):73.
9. Evans K. Diabetic ketoacidosis: update on management. *Clin Med (Lond)*. 2019;19(5):396–8.
10. Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2019;12:1179551419844521.
11. Dendup T, Feng X, Clingan S, Astell-Burt T. Environmental Risk Factors for Developing Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1):78.
12. Fonseca VA. Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(Suppl 2):S151–6.
13. Type 2 Diabetes Mellitus [Internet]. Medscape; 2020 [citirano 20. travnja 2020]. Dostupno na <https://www.medscape.com/>
14. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1185–200.
15. Vigersky RA. An overview of management issues in adult patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol*. 2011;5(2):245–50.

16. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(4):546–51.
17. Sanghera DK, Blackett PR. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *J Diabetes Metab.* 2012;3(198):6948.
18. Remiche G, Kadhim H, Maris C, Mavrouidakis N. Les neuropathies périphériques, du diagnostic au traitement, revue de la littérature et enseignements de l'expérience locale [Peripheral neuropathies, from diagnosis to treatment, review of the literature and lessons from the local experience]. *Rev Med Brux.* 2013;34(4):211–20.
19. Hammi C, Yeung B. Neuropathy. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [citirano 20. travnja 2020]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542220/>
20. Sommer C, Geber C, Young P, Forst R, Birklein F, Schoser B. Polyneuropathies. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(6):83–90.
21. Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes.* 2015;6(3):432–44.
22. Barada A, Vučković Rebrina S. Neurološke komplikacije u šećernoj bolesti. *MEDIX,* 2009; 15, (80/81):158–63.
23. Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Investig.* 2011;2(1):18–32.
24. Wright JA, Richards T, Becker DL. Connexins and diabetes. *Cardiol Res Pract.* 2012;2012:496904.
25. Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(5):R1143–55.
26. Kavvadas P, Abed A, Poulain C, Authier F, Labéjof LP, Calmont A, i sur. Decreased Expression of Connexin 43 Blunts the Progression of Experimental GN. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(10):2915–30.
27. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(3):191–200.
28. Tonkin RS, Mao Y, O'Carroll SJ, Nicholson LF, Green CR, Gorrie CA, i sur. Gap junction proteins and their role in spinal cord injury. *Front Mol Neurosci.* 2015;7:102.
29. Wu J, Wang L. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):8.
30. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006;394(Pt 3):527–43.

31. Đikić D. Fiziologija čovjeka. Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 2017/18.
32. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel K, i sur. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* 1997;16(2):188–90.
33. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, i sur. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):408–18.
34. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, i sur. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science.* 1993;262(5142):2039–42.
35. Moreno AP. Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):276–86.
36. Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL, Paul DL. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell.* 1993;4(1):7–20.
37. Gabriels JE, Paul DL. Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res.* 1998;83(6):636–43.
38. Zhao Y, Xin Y, He Z, Hu W. Function of Connexins in the Interaction between Glial and Vascular Cells in the Central Nervous System and Related Neurological Diseases. *Neural Plast.* 2018;2018:6323901.
39. Boulay AC, Mazeraud A, Cisternino S, Saubaméa B, Mailly P, Jourden L, i sur. Immune quiescence of the brain is set by astroglial connexin 43. *J Neurosci.* 2015;35(10):4427–39.
40. Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(3):H1241–8.
41. Nógrádi A, Vrbová G. *Anatomy and Physiology of the Spinal Cord.* U: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. [citirano 11. svibnja 2020]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5974/>
42. Chapter 3: Anatomy of the Spinal Cord [Internet]. U: Neuroscience online [citirano 11. svibnja 2020]. Dostupno na: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/>
43. Ganapathy MK, Reddy V, Tadi P. *Neuroanatomy, Spinal Cord Morphology.* U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan- [citirano 11. svibnja 2020]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685/>

44. Krotov V, Tokhtamysh A, Kopach O, Dromaretsky A, Sheremet Y, Belan P, i sur. Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:342.
45. Rajchgot T, Thomas SC, Wang JC, Ahmadi M, Balood M, Crosson T, i sur. Neurons and Microglia; A Sickly-Sweet Duo in Diabetic Pain Neuropathy. *Front Neurosci.* 2019;13:25.
46. Duarte JM. Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. *Aging Dis.* 2015;6(5):304–21.
47. Nagayach A, Patro N, Patro I. Experimentally induced diabetes causes glial activation, glutamate toxicity and cellular damage leading to changes in motor function. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:355.
48. Dong A, Liu S, Li Y. Gap Junctions in the Nervous System: Probing Functional Connections Using New Imaging Approaches. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:320.
49. Lapato AS, Tiwari-Woodruff SK. Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *J Neurosci Res.* 2018;96(1):31–44.
50. Giaume C, Naus C. Connexins, gap junctions, and glia. *WIREs Membr Transp Signal* 2013, 2:133–42.
51. Moore KB, O'Brien J. Connexins in neurons and glia: targets for intervention in disease and injury. *Neural Regen Res.* 2015;10(7):1013–17.
52. Kreuzberg MM, Deuchars J, Weiss E, Schober A, Sonntag S, Wellershaus K, i sur. Expression of connexin 30.2 in interneurons of the central nervous system in the mouse. *Mol Cell Neurosci.* 2008;37(1):119–34.
53. Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, i sur. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7573–8.
54. Belousov AB, Fontes JD. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. *Trends Neurosci.* 2013;36(4):227-236.
55. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 4:9.
56. Lin SH, Lu CY, Muhammad R, Chou WY, Lin FC, Wu PC, i sur. Induction of connexin 37 expression in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;99(2):134–40.

57. Lavrov I, Fox L, Shen J, Han Y, Cheng J. Gap Junctions Contribute to the Regulation of Walking-Like Activity in the Adult Mudpuppy (*Necturus Maculatus*). PLoS One. 2016;11(3):e0152650.
58. Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. J Neurosci. 1999;19(24):10813–28.
59. Morel S, Burnier L, Kwak BR. Connexins participate in the initiation and progression of atherosclerosis. Semin Immunopathol. 2009;31(1):49–61.
60. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. J Mol Cell Cardiol. 2016;92:163–73.
61. Takenaka T, Inoue T, Okada H, Ohno Y, Miyazaki T, Chaston DJ, i sur. Altered gap junctional communication and renal haemodynamics in Zucker fatty rat model of type 2 diabetes. Diabetologia. 2011;54(8):2192–201.
62. Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. Mol Endocrinol. 2008;22(12):2643–54.
63. Krutovskikh V, Troyanovsky S, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H, i sur. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin 43 on tumor cell growth in vivo. Oncogene. 2000;19, 505–13.
64. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sulkowska M. Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. Oncology. 2005;68(2-3):217–22.
65. Menecier G, Derangeon M, Coronas V, Hervé JC, Mesnil M. Aberrant expression and localization of connexin43 and connexin30 in a rat glioma cell line. Mol Carcinog. 2008;47(5):391–401.
66. Rodriguez-Jimenez FJ, Alastrue-Agudo A, Stojkovic M, Erceg S, Moreno-Manzano V. Connexin 50 Expression in Ependymal Stem Progenitor Cells after Spinal Cord Injury Activation. Int J Mol Sci. 2015;16(11):26608–18.
67. Dang X, Doble BW, Kardami E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. Mol Cell Biochem. 2003;242: 35–8.
68. Ke Q, Li L, Cai B, Liu C, Yang Y, Gao Y, i sur. Connexin 43 is involved in the generation of human-induced pluripotent stem cells. Hum Mol Genet. 2013;22(11):2221–33.



69. Personius KE, Chang Q, Mentis GZ, O'Donovan MJ, Balice-Gordon RJ. Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11808–13.
70. Makino A, Platoshyn O, Suarez J, Yuan JX, Dillmann WH. Downregulation of connexin 40 is associated with coronary endothelial cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(1):C221–30.
71. Zeng O, Li F, Li Y, Li L, Xiao T, Chu C, et al. Effect of Novel Gasotransmitter hydrogen sulfide on renal fibrosis and connexins expression in diabetic rats. *Bioengineered*. 2016;7(5):314–20.
72. Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:23.
73. Wang GY, Bi YG, Liu XD, Han JF, Wei M, Zhang QY. Upregulation of connexin 43 and apoptosis-associated protein expression by high glucose in H9c2 cells was improved by resveratrol via the autophagy signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):3262–8.
74. Ball KK, Harik L, Gandhi GK, Cruz NF, Dienel GA. Reduced gap junctional communication among astrocytes in experimental diabetes: contributions of altered connexin protein levels and oxidative-nitrosative modifications. *J Neurosci Res*. 2011;89(12):2052–67.
75. Gandhi GK, Ball KK, Cruz NF, Dienel GA. Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro*. 2010;2(2):e00030.
76. Chapman RJ, Lall VK, Maxeiner S, Willecke K, Deuchars J, King AE. Localization of neurones expressing the gap junction protein Connexin45 within the adult spinal dorsal horn: a study using Cx45-eGFP reporter mice. *Brain Struct Funct*. 2013;218(3):751–65.
77. Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;47(1-3):191–215.
78. Alsarraf H, Kelly K, Anderson C, Rhett M. Connexins in the Brain: Psychopharmaceutical Implications. *Neuropsychiatry*. 2017;7 (5): 591–5.
79. Pastor A, Kremer M, Möller T, Kettenmann H, Dermietzel R. Dye coupling between spinal cord oligodendrocytes: differences in coupling efficiency between gray and white matter. *Glia*. 1998;24(1):108–20.
80. Dermietzel R, Farooq M, Kessler JA, Althaus H, Hertzberg EL, Spray DC. Oligodendrocytes express gap junction proteins connexin32 and connexin45. *Glia*. 1997;20(2):101–14.

81. Howarth FC, Nowotny N, Zilahi E, El Haj MA, Lei M. Altered expression of gap junction connexin proteins may partly underlie heart rhythm disturbances in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2007;305(1-2):145–51.
82. Fabbiani G, Reali C, Valentín-Kahan A, Reherrmann MI, Fagetti J, Falco MV, i sur. Connexin Signaling Is Involved in the Reactivation of a Latent Stem Cell Niche after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2020;40(11):2246–58.
83. Rodriguez-Jimenez FJ, Alastrue A, Stojkovic M, Erceg S, Moreno-Manzano V. Connexin 50 modulates Sox2 expression in spinal-cord-derived ependymal stem/progenitor cells. *Cell Tissue Res.* 2016;365(2):295–307.
84. Russo RE, Reali C, Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *J Neurosci.* 2008;28(13):3298-309.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj:** Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi izražaj i raspored koneksina (Cx) 37, 40, 43 i 45 u kralježničnoj moždini štakora te njihove eventualne promjene u kratkotrajnoj šećernoj bolesti izazvanoj aplikacijom streptozotocina u štakora.

**Materijal i metode:** Deset muških štakora soja Sprague-Dawley podijeljeno je u dvije skupine, kontrolna skupina (K) i dijabetična (DM). U dijabetičnoj skupini štakorima je aplicirano intraperitonealno 55 mg/kg streptozotocina (STZ), koji je otopljen u citratnom puferu (pH 4.5), kako bi se inducirala šećerna bolest tipa 1, a štakori koji su korišteni kao kontrola dobili su čisti citratni pufer. Životinje su eutanazirane nakon dva tjedna te im je uklonjena kralježnična moždina. Tkivo je uklopljeno u parafin. Rezovi tkiva obojani su imunohistokemijski korištenjem protutijela protiv Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45. Uzorci su pregledani pomoću epifluorescencijskog mikroskopa. Mikrofotografije rezova su analizirane pomoću Adobe Photoshop i Image J programa. Analizirano je područje dorzalnog roga i područje oko (uključivo) centralnog kanala. Rezultati su statistički obrađeni korištenjem Mann Whitney testa ili Kruskal-Wallis testa s Dunn-ovim *post-hoc* testom za višestruke usporedbe, pri čemu je  $p < 0.05$  smatrano značajnom razlikom.

**Rezultati:** Na histološkim rezovima kralježnične moždine štakora pronašli smo imunoreaktivnost Cx37 i Cx40 u neuronima, dok je izražaj Cx43 bio najjači u okolnoj gliji. Cx45 pronašli smo u bijeloj tvari, kao i oko mijeliniziranih vlakana, gdje je uočen i Cx37. U krvnim žilama pronađeni su Cx37, Cx40 i Cx43, dok su u endimskim stanicama centralnog kanala bila izražena sva četiri istraživana koneksina. Usporedbom izražaja pojedinih koneksina, utvrdili smo najviši izražaj Cx43, značajno više u odnosu na sve ostale istraživane koneksine, kako u kontrolnoj, tako i u dijabetičnoj skupini štakora; nakon čega slijedi izražaj Cx40, a najmanje su u kralježničnoj moždini štakora zastupljeni Cx37 i Cx45. Analizom izražaja koneksina u području dorzalnog roga uočeno je statistički značajno smanjenje izražaja Cx40 u skupini DM u odnosu na K skupinu ( $p < 0.01$ ). U području (uključivo) centralnog kanala uočen je značajan porast izražaja Cx37 i Cx43 ( $p < 0.05$ ) i pad izražaja Cx40 ( $p < 0.01$ ). Izražaj Cx45 nije se značajno razlikovao u DM u usporedbi s K skupinom.

**Zaključak:** Koneksin 37 i Cx40 su u kralježničnoj moždini štakora prvenstveno izraženi u neuronima, dok je Cx43 prvenstveno izražen u astrocitima i mikrogliji, a Cx45 u oligodendrogliji. Eksperimentalni DM1 u štakora u početnoj fazi uzrokuje poremećaj izražaja različitih tipova koneksina, pri čemu se izražaj Cx40 smanjuje, a izražaj Cx43 i Cx37 raste. Promjene izražaja koneksina koje smo utvrdili u kralježničnoj moždini dijabetičnih štakora

mogle bi imati značajnu ulogu u procesima maladaptacije somato- i viscerosenzornih puteva izazvanim dijabetesom, kao i utjecati na reaktivnost kralježnične moždine na potencijalnu ozljedu.

## **9. SUMMARY**

**Title:** Expression of connexin in the spinal cord of rats with short-term type 1 diabetes

**Objective:** The aim of this study was to determine the expression and distribution of connexins (Cx) 37, 40, 43 and 45 in the spinal cord of rats and their possible changes in short-term diabetes caused by the application of streptozotocin in rats.

**Materials and methods:** Ten male Sprague-Dawley rats were divided into two groups, control group (K) and diabetic (DM). In the diabetic group, rats were administered intraperitoneally 55 mg/kg streptozotocin (STZ), dissolved in citrate buffer (pH 4.5), to induce type 1 diabetes, and rats used as controls received pure citrate buffer. The animals were euthanized after two weeks and their spinal cord was removed. The tissue is embedded in paraffin. Tissue sections were stained immunohistochemically using antibodies against Cx37, Cx40, Cx43, and Cx45. The samples were examined using an epifluorescence microscope. Photomicrographs were analyzed using Adobe Photoshop and Image J. The area of the dorsal horn and the area around (inclusively) the central canal were analyzed. Results were statistically processed using the Mann Whitney test or the Kruskal-Wallis test with the Dunn post-hoc test for multiple comparisons, with  $p < 0.05$  being considered a significant difference.

**The results:** On histological sections of the spinal cord of rats, we found the immunoreactivity of Cx37 and Cx40 in neurons, while the expression of Cx43 was strongest in the surrounding glia. Cx45 was found in white matter as well as around myelinated fibers, where Cx37 was also observed. Cx37, Cx40, and Cx43 were found in blood vessels, while all four investigated connexins were expressed in ependymal cells of the central canal. By comparing the expression of individual connexins, we found the highest expression of Cx43, significantly higher than all other studied connexins, both in the control and diabetic groups of rats; followed by the expression Cx40, and the least represented in the spinal cord of rats were Cx37 and Cx45. Analysis of connexin expression in the dorsal horn area showed a statistically significant decrease in Cx40 expression in the DM group compared to the K group ( $p < 0.01$ ). In the area (inclusive) of the central canal, a significant increase in the expression of Cx37 and Cx43 ( $p < 0.05$ ) and a decrease in the expression of Cx40 ( $p < 0.01$ ) were observed. The expression of Cx45 did not differ significantly in DM compared to the K group.

**Conclusion:** Connexin 37 and Cx40 are primarily expressed in neurons in the spinal cord of rats, while Cx43 is primarily expressed in astrocytes and microglia, and Cx45 in oligodendroglia. Experimental DM1 in rats in the initial stage causes a disturbance in the

expression of different types of connexins, with the expression of Cx40 decreasing and the expression of Cx43 and Cx37 increasing. Changes in connexin expression found in the spinal cord of diabetic rats could play a significant role in the processes of maladaptation of somato- and viscerosensory pathways caused by diabetes, as well as affect the reactivity of the spinal cord to potential injury.



## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podatci:**

**Ime i prezime:** Silvia Dužević

**Datum rođenja:** 03. siječnja 1995.

**Mjesto rođenja:** Split, Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Ulica Alojzija Stepinca 16, Split

**E-mail:** duzevics@gmail.com

**Obrazovanje:**

**2014. – 2020.** Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Split

**2009. – 2013.** 1. jezična gimnazija, Split

**2001. – 2009.** Osnovna škola "Gripe", Split

**Radno iskustvo:**

**2009. – 2015.** konobar u restoranu Antika, Stari Grad, Hvar (sezonski posao)

**2015. – 2019.** konobar u restoranu Jurin podrum, Stari Grad, Hvar (sezonski posao)

**Nagrade i priznanja:** rektorova nagrada Sveučilišta u Splitu kao dio sekcije NeuroSplit (2019.).

**Rad na računalu i programima:** Microsoft Office (Excel, Word i PowerPoint), Adobe Photoshop, ImageJ

**Strani jezik:** engleski jezik (B2 razina), njemački jezik (B1 razina), španjolski jezik (B1)

**Vozačka dozvola:** B kategorija