

Izražaj koneksina i paneksina u bubrezima štakora na modelima dijabetesa tipa 1 i metaboličkog sindroma u ovisnosti o suplementaciji polinezasićenim masnim kiselinama i terapiji metforminom i liraglutidom

Luetić, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:819362>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MARTINA LUETIĆ

**IZRAŽAJ KONEKSINA I PANEKSINA U BUBREZIMA ŠTAKORA NA
MODELIMA DIJABETESA TIP 1 I METABOLIČKOG SINDROMA U
OVISNOSTI O SUPLEMENTACIJI POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA I TERAPIJI METFORMINOM I LIRAGLUTIDOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2022.

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

Istraživanja su dio znanstveno-istraživačkog projekta „Nutritivna modulacija metabolizma dokozaheksaenske kiseline kod dijabetičke dislipidemije” (HRZZ-IP-2014-09-8992) te su dio suradnje i istraživanja *Cedars-Sinai Medical Center’s International Research and Innovation in Medicine Program, the Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology (RECOOP HST Association)*, uz sudjelovanje *Cedars-Sinai Medical Center - RECOOP Research Centers (CRRCs)*. Animalni eksperimenti provedeni su u Institutu za medicinska istraživanja u Zagrebu te na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Szegedu, uz suradnju Medicinskog fakulteta u Osijeku i Sveučilišta Semmelweis u Budimpešti.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović na pomoći, podršci, razumijevanju, strpljenju i prenesenom znanju. Uz Vas sam puno naučila te sam postavila dobre temelje za buduće znanstvene korake. Od srca Vam hvala na svemu!

Mojoj obitelji i prijateljima hvala što su vjerovali u mene sve ove godine i bili mi vječni izvor ljubavi, motivacije i utjehe. Bez vas bi se izgubio svaki smisao!

Posvećujem ovaj rad svojoj djeci, najvećem osloncu i neopisivom vrelu sreće.

Sadržaj:

1. UVOD.....	10
1.1. Bubrežni aparati.....	11
1.1.1. Anatomija bubrega.....	11
1.1.2. Histologija bubrega.....	12
1.1.2.1. Bubrežno tjelešće.....	13
1.1.2.2. Sustav kanalića.....	15
1.1.3. Bubrežni krvotok.....	15
1.1.4. Funkcije bubrega.....	16
1.2. Koneksini i paneksini.....	16
1.2.1. Koneksini.....	16
1.2.1.1. Koneksini u bubrezima.....	18
1.2.2. Paneksini.....	19
1.2.2.1. Paneksini u bubrezima.....	20
1.3. Šećerna bolest.....	21
1.3.1. Šećerna bolest tipa 1.....	21
1.3.2. Šećerna bolest tipa 2.....	22
1.3.3. Gestacijska šećerna bolest.....	23
1.3.4. Posebni tipovi šećerne bolesti.....	24
1.3.5. Dijagnoza šećerne bolesti.....	24
1.3.6. Komplikacije šećerne bolesti.....	25
1.3.6.1. Dijabetička nefropatija.....	26
1.3.7. Koneksini i paneksini u šećernoj bolesti.....	28
1.4. Kronična bolest bubrega.....	30
1.5. Metabolički sindrom.....	32
1.5.1. Koneksini i paneksini u metaboličkom sindromu.....	36
1.6. Terapijske mogućnosti u liječenju šećerne bolesti i metaboličkoga sindroma.....	36
1.6.1. Polinezasićene masne kiseline.....	37
1.6.2. Metformin.....	39
1.6.3. Liraglutid.....	42
2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	46
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	48
4. MATERIJALI I METODE.....	50
4.1. Pokusne životinje za model šećerne bolesti tipa 1.....	51
4.2. Pokusne životinje za model metaboličkoga sindroma.....	52
4.3. Obrada bubrega za daljnju analizu.....	53
4.4. Priprema tkiva za imunohistokemiju, imunofluorescenciju te histološke metode.....	54
4.5. Analiza slika i kvantifikacija.....	56
4.5.1. Imunohistokemijska analiza.....	56

4.5.2.	Patohistološka analiza.....	57
4.6.	Statističke analize	58
5.	REZULTATI.....	59
5.1.	Lokalizacija Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima dijabetičnih štakora.....	60
5.2.	Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i prehrane bogate polinezasićenim masnim kiselinama na izražaj Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima štakora.....	60
5.3.	Biokemijski parametri i mase bubrega štakora na dugotrajnoj prehrani s visokim udjelom masti i šećera	65
5.4.	Utjecaj metformina i liraglutida na debljinu Bowmanove čahure u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera.....	66
5.5.	Utjecaj metformina i liraglutida na stupanj glomeruloskleroze u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera	68
5.6.	Utjecaj metformina i liraglutida na stupanj tubulointersticijske fibroze u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera.....	68
5.7.	Utjecaj metformina i liraglutida na mitohondrije u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera	70
5.8.	Lokalizacija i izražaj Cx45 i Panx1 u bubrezima štakora na dugotrajnoj prehrani s visokim udjelom masti i šećera	72
6.	RASPRAVA	76
6.1.	Izražaj koneksina i paneksina 1 u bubrezima dijabetičnih štakora i štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera	77
6.2.	Utjecaj prehrane bogate polinezasićenim masnim kiselinama te terapije metforminom i liraglutidom na izražaj koneksina i paneksina 1 u bubrezima štakora	80
6.3.	Patohistološke promjene u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera uz terapiju metforminom i liraglutidom	83
7.	ZAKLJUČCI.....	87
8.	LITERATURA.....	89
9.	SAŽETAK	104
10.	SUMMARY	107
11.	ŽIVOTOPIS	110

POPIS OZNAKA I KRATICA

AA	arahidonska kiselina (engl. <i>arachidonic acid</i>)
AACE	engl. <i>the American Association of Clinical Endocrinology</i>
ACR	omjer albumina i kreatinina (engl. <i>albumin creatinine ratio</i>)
ADA	engl. <i>American Diabetes Association</i>
AHA/NHLBI	engl. <i>the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute</i>
ALA	alfa-lipoična kiselina (engl. <i>alpha lipoic acid</i>)
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
BC	Bowmanova čahura (engl. <i>Bowman's capsule</i>)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i>)
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CRP	C-reaktivni protein
DAPI	4', 6-diamid-2-fenilindol (engl. <i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DBA	lat. <i>Dolichos Biflorus Agglutinin</i>
DHA	dokozaheksaenska kiselina (engl. <i>docosahexaenoic acid</i>)
DM	lat. <i>diabetes mellitus</i>
DM1	lat. <i>diabetes mellitus typus 1</i>
DM2	lat. <i>diabetes mellitus typus 2</i>
DN	dijabetička nefropatija
DPA	dokozapentaenska kiselina (engl. <i>docosapentaenoic acid</i>)
DPP-4	dipeptidil-peptidaza 4
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
EGFR	procijenjena stopa glomerularne filtracije (engl. <i>estimated glomerular filtration rate</i>)
EGIR	engl. <i>European Group for the study of Insuline Resistance</i>
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija
EPA	eikozapentaenska kiselina (engl. <i>eicosapentaenoic acid</i>)
ER	endoplazmatski reticulum
FPG	engl. <i>fasting plasma glucose</i>
GAD	engl. <i>glutamic acid decarboxylase</i>
GBM	glomerularna bazalna membrana

GDM	engl. <i>gestational diabetes mellitus</i>
GFR	stopa glomerularne filtracije (engl. <i>glomerular filtration rate</i>)
GLP-1	engl. <i>glucagone-like peptide 1</i>
GLP-1R	engl. <i>glucagone-like peptide 1 receptor</i>
GLUT4	engl. <i>glucose transporter type 4</i>
HDL	engl. <i>high density lipoprotein</i>
HFD	prehrana s visokim udjelom masti (engl. <i>high fat diet</i>)
HFHFrD	prehrana s visokim udjelom masti i fruktoze (engl. <i>high fat high fructose diet</i>)
HFHSD	prehrana s visokim udjelom masti i šećera (engl. <i>high fat high sugar diet</i>)
HFrD	prehrana s visokim udjelom fruktoze (engl. <i>high fructose diet</i>)
HgbA1c	hemoglobin A1c
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
ICA	engl. <i>islet cell antibody</i>
IDF	engl. <i>International Diabetes Federation</i>
IFG	engl. <i>impaired fasting glucose</i>
IGT	engl. <i>impaired glucose tolerance</i>
IL-6	interleukin 6
IP3	inozitol trifosfat (engl. <i>inositol triphosphate</i>)
IPGTT	intraperitonealni test opterećenja glukozom (engl. <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)
JGA	jukstaglomerularni aparat
KBB	kronična bolest bubrega
KDIGO	engl. <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
LA	linolna kiselina (engl. <i>linoleic acid</i>)
LADA	engl. <i>latent autoimmune diabetes in adults</i>
LEADER	engl. <i>Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of cardiovascular outcome Results</i>
LDL	engl. <i>low density lipoprotein</i>

LTL	lat. <i>Lotus Tetragonolobus Lectin</i>
MATE	engl. <i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MODY	engl. <i>maturity onset diabetes of the young</i>
MD	lat. <i>macula densa</i>
MS	metabolički sindrom
MUFA	mononezasićene masne kiseline (engl. <i>monounsaturated fatty acids</i>)
NAD+	nikotinamid adenin dinukleotid (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NCEP:ATPIII	engl. <i>the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
OCT	engl. <i>organic cation transporter</i>
OGTT	oralni test opterećenja glukoze (engl. <i>oral glucose tolerance test</i>)
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena 1 (engl. <i>plasminogen activator inhibitor 1</i>)
PAS	perjodna kiselina i Schiffov reagens (engl. <i>periodic acid-Schiff</i>)
PBS	fosfatni puffer (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PEC	parijetalna epitelna stanica (engl. <i>parietal epithelial cell</i>)
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PMAT	engl. <i>plasma membrane monoamine transporter</i>
PTAH	fosfovolframska kiselina i hematoksilin (engl. <i>phosphotungstic acid haematoxylin</i>)
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
SFA	zasićene masne kiseline (engl. <i>saturated fatty acids</i>)
STZ	streptozotocin
TAG	trigliceridi (engl. <i>triacylglycerols</i>)
TGF- β 1	transformirajući čimbenik rasta beta 1 (engl. <i>transforming growth factor β1</i>)
TNF- α	tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
UUO	unilateralna ureteralna opstrukcija
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

1. UVOD

1.1. Bubrezi

Bubrezi su parni organi složene građe i funkcije. Oblika je zrna graha, crvenosmeđ, mase 115 – 170 g, duljine otprilike 11 cm, širine 5 – 8 cm i debljine 3 cm (1). Iako bubrezi čine samo 0,4 % tjelesne mase, primaju čak 20 % srčanoga minutnog volumena (2). Kontinuirano filtriraju krvnu plazmu te tako održavaju homeostazu vode i elektrolita te acidobaznu ravnotežu (3).

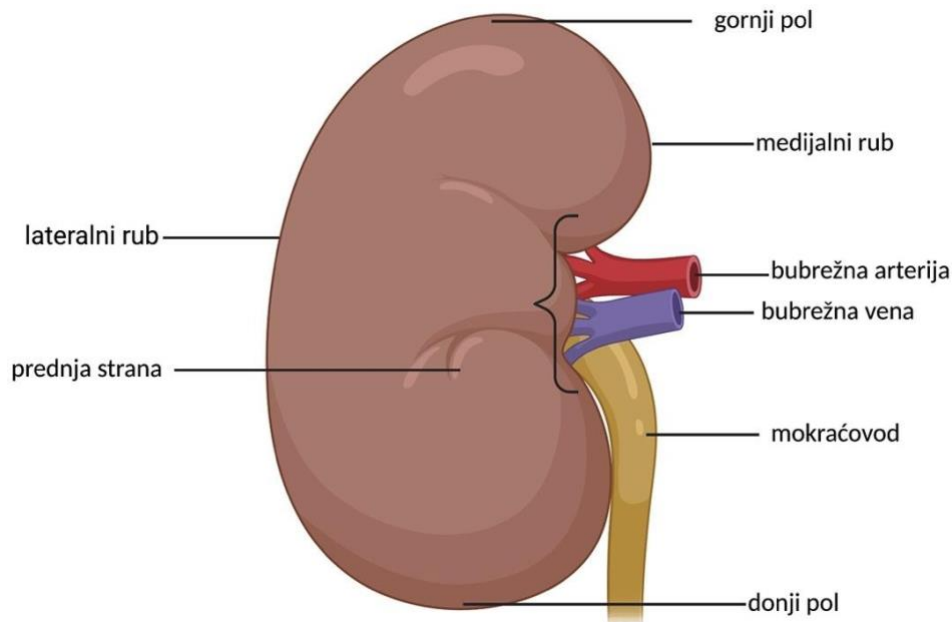
1.1.1. Anatomija bubrega

Bubrezi su smješteni retroperitonealno, između 12. torakalnoga i 3. lumbalnoga kralješka, s time da je desni bubrezi, zbog položaja jetre, smješten nešto niže. Bubrezi imaju prednju (lat. *facies anterior*) i stražnju stranu (lat. *facies posterior*), gornji (lat. *extremitas superior*) i donji pol (lat. *extremitas inferior*) te lateralni (lat. *margo lateralis*) i medijalni rub (lat. *margo medialis*). Lateralni je rub u cijelosti konveksan, dok je medijalni konveksan na krajevima, a u središnjem dijelu konkavan. U području konkavnoga dijela medijalnoga ruba okomita je pukotina, hilus (lat. *hilum renale*). Unutar hilusa smješteni su: bubrežna nakapnica (lat. *pelvis renalis*), krvne žile te živci. Krvne su žile smještene sprijeda, i to bubrežna vena ispred bubrežne arterije, a iza njih je bubrežna nakapnica. Bubrežna je nakapnica proširenje mokraćovoda, a nastaje spajanjem dvaju ili triju velikih bubrežnih vrčeva (lat. *calices renales majores*) od kojih svaki nastaje spajanjem dvaju ili triju malih bubrežnih vrčeva (lat. *calices renales minores*) (1,4).

Površinu bubrega oblaže tanka vezivna ovojnica – bubrežna kapsula. Svaki je bubrezi sa svojom kapsulom obavijen slojem perirealnoga masnog tkiva. Iznad sloja masnoga tkiva nalazi se bubrežna (Gerotina) fascija koja dijeli retroperitonealni prostor u tri odjeljka: stražnji pararenalni, intermedijarni perirealni i prednji pararenalni. S prednje strane bubrezi je još prekriven slojem peritoneuma, a sa stražnje se nalazi pararenalno masno tkivo (5).

Na presjeku bubrega razlikujemo dva dijela: vanjski dio, odnosno koru (lat. *cortex*) te unutrašnji dio, srž (lat. *medulla*). Dio se kore u obliku izdanaka (lat. *columnae renales*) proteže među bubrežnim piramidama prema bubrežnom sinus. Od baze piramida u koru se pružaju usporedni sržni tračci (lat. *radii medulares*) (6,7). Srž se sastoji od pet do jedanaest bubrežnih piramida (lat. *pyramides renales*) koje se vrlo lako uočavaju jer su svjetlije od okolnoga bubrežnog parenhima. Vrhovi piramida usmjereni su prema bubrežnom sinus, a njihove su

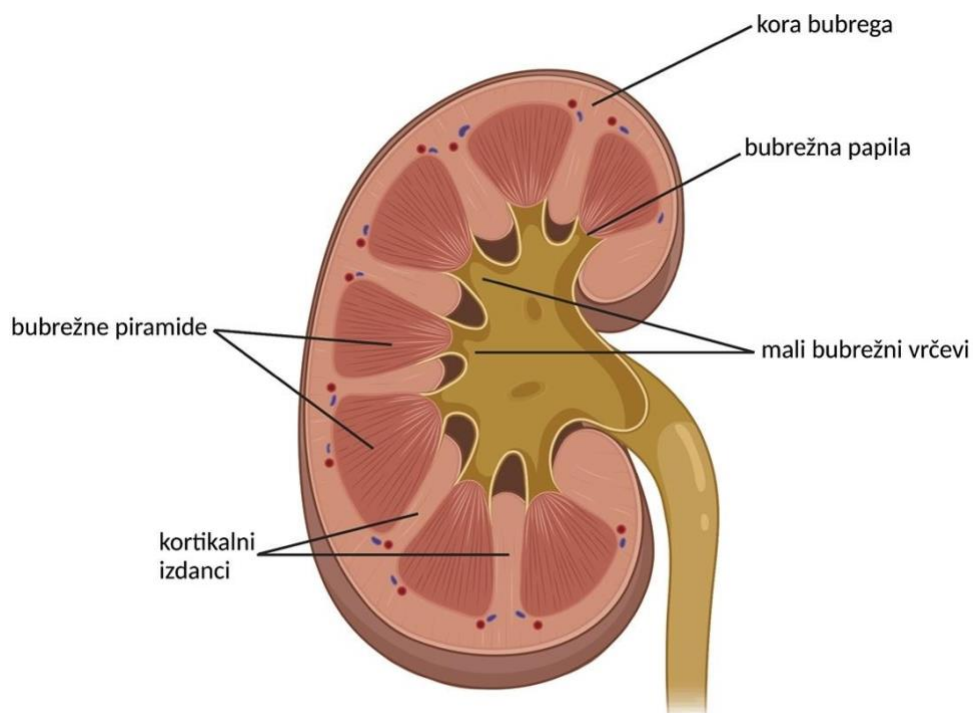
baze okrenute prema kori. Vrhove piramida čine bubrežne papile (lat. *papillae renales*) na kojima se otvaraju brojni mali otvori izvodnih kanalića bubrega koji su okruženi malim bubrežnim vrčevima (1,7).



Slika 1. Vanjski izgled desnoga bubrega. Područje hilusa označeno je vitičastom zagradom. Izrađeno pomoću programa BioRender.

1.1.2. Histologija bubrega

Osnovna je funkcionalna jedinica bubrega nefron. U svakom je bubregu od jedan do četiri milijuna nefrona koji se sastoje od bubrežnoga tjelešca, proksimalnoga zavijenog kanalića, Henleove petlje, distalnoga zavijenog kanalića te sabirnih cjevčica. Spajanjem sabirnih cjevčica nastaju sabirne cijevi (Bellinijevi papilarni kanalići) koje tvore bubrežne papile te se otvaraju na vrhovima piramida. U ljudskom je bubregu 4–18 papila (3). Henleova petlja građena je od ravnih dijelova (lat. *pars recta*) proksimalnoga i distalnoga kanalića te intermedijarnoga kanalića te ima silazni (lat. *pars descendens*) i uzlazni (lat. *pars ascendens*) dio. S obzirom na duljinu i smještaj Henleove petlje, postoje dva tipa nefrona: kortikalni i jukstamedularni nefron (7).



Slika 2. Koronarni presjek bubrega s prikazanom unutrašnjom građom. Izrađeno pomoću programa BioRender.

1.1.2.1. Bubrežno tjelešće

Bubrežno tjelešće sastavljeno je od glomerula, klupka krvnih kapilara koje je okruženo Bowmanovom čahurom (engl. *Bowman's capsule*, BC). Bowmanova čahura građena je od unutrašnjega ili visceralnoga lista te vanjskoga, odnosno parijetalnoga lista. Među listovima nalazi se Bowmanov (urinarni) prostor u kojemu se nalazi glomerularni filtrat. Visceralni list čine podociti, epitelne stanice građene od velikoga staničnog tijela (lat. *perikaryon*) te primarnih i sekundarnih citoplazmatskih izdanaka. Stanično tijelo podocita prominira u Bowmanov prostor. Sekundarni izdanci, nožice, međusobno se spajaju te tvore filtracijske proreze širine 35 – 50 nm. Dno filtracijskoga proreza čini dijafragma. Podociti svojim nožicama obuhvaćaju glomerularne kapilare te su u izravnom kontaktu s glomerularnom bazalnom membranom (GBM) (6).

Glomerularna bazalna membrana sastavljena je od bazalne membrane podocita i bazalne membrane endotelnih stanica glomerularnih kapilara. Čine je tri sloja: *lamina rara interna*, *lamina densa* i *lamina rara externa*. Debljina GBM-a veća je od debljine drugih kapilarnih bazalnih membrana te iznosi 250 do 350 nm. S unutrašnje strane, prema lumenu kapilara,

GBM je obložen endotelnim stanicama. Endotel glomerularnih kapilara fenestriran je te se sastoji od velikih zaravnjenih stanica s porama čiji je promjer od 50 do 100 nm (8).

Endotelne stanice s GBM-om i podocitima čine glomerularnu filtracijsku barijeru. Ona predstavlja selektivan filter koji sprječava prolazak određenih molekula iz krvi u bubrežni tubularni sustav. Primjerice, velike molekule (krvne stanice, trombociti, albumini), kao i negativno nabijene molekule, ostaju u glomerularnim kapilarama te se eferentnom arteriolom vraćaju iz glomerula u venski sustav (9). Parijetalni list BC-a sastoji se od jednoslojnoga pločastog epitela s primarnim cilijama i čvrstim međustaničnim spojevima. Te stanice nazivamo glomerularne parijetalne epitelne stanice (engl. *parietal epithelial cells*, PEC) (10).

Bubrežno tjelešce sadrži dva pola – urinarni i vaskularni koji su smješteni jedan nasuprot drugome. Na urinarnom je polu polazište proksimalnoga zavijenog kanalića (lat. *pars convoluta*). U tom području epitel parijetalnoga lista BC-a prelazi u jednoslojni kubični ili niski cilindrični. Na vaskularnom polu aferentna arteriola ulazi u bubrežno tjelešce, a eferentna arteriola izlazi. Tu jednoslojni pločasti epitel parijetalnog lista BC-a postaje visceralni list s podocitima (6–8). Neposredno uz vaskularni pol, na mjestu gdje se na njega prislanja ravni dio (lat. *pars recta*) distalnoga kanalića, nalazi se *macula densa* (MD). Ona je dio jukstaglomerularnoga aparata (JGA) koji je ključan u regulaciji bubrežnoga protoka krvi i brzine glomerularne filtracije. Stanice MD-e prate koncentraciju natrijevih iona u tubularnoj tekućini te na temelju toga reguliraju tonus arteriola. Uz stanice MD-e, dio su JGA-a ekstraglomerularne mezangijske stanice koje su smještene u području vaskularnog pola te jukstaglomerularne stanice koje luče renin. Jukstaglomerularne stanice se zbog svoje granulirane citoplazme nazivaju i zrnatim stanicama (8,11).

Intraglomerularne mezangijske stanice podupiru glomerularne kapilare te tako održavaju glomerularnu strukturu (12). Uz to imaju kontraktilnu i fagocitnu ulogu. Sposobnost kontrakcije mezangijskih stanica omogućava mijenjanje promjera glomerularnih kapilara čime se regulira brzina glomerularne filtracije. Mezangijske stanice sa svojim ekstracelularnim matriksom čine mezangij (13).

1.1.2.2. *Sustav kanalića*

Epitel proksimalnih zavijenih kanalića kubičan je te je prekriven četkastom prevlakom gusto smještenih mikrovila. Granice među pojedinim epitelnim stanicama nisu jasno vidljive. Njihove se citoplazme intenzivno bojaju kiselim (acidofilnim) bojama te se doimaju znatim (6). Upravo zbog epitela koji prominira u lumen kanalića, te četkaste prevlake na njegovoj površini, lumen je proksimalnoga zavijenog kanalića nepravilan (7).

Distalni zavijeni kanalići nešto su manjega promjera, ali je njihov lumen širi i pravilan. Epitel je niži, zaravnjen, bez četkastoga obruba na površini, uz jasnu granicu među susjednim stanicama. Jezgre epitelnih stanica imaju diskoidan oblik (8).

Kortikalne sabirne cjevčice obložene su jednoslojnim kubičnim epitelom, dok su one smještene unutar srži bubrega obložene jednoslojnim cilindričnim epitelom (6). Jednoslojni kubični epitel kortikalnih sabirnih cjevčica sadrži glavne i interkalirane stanice. Glavne stanice imaju svjetlu citoplazmu i okrugle jezgre, a interkalirane stanice tamnije su obojenih citoplazmi. Cilindrični je epitel medularnih sabirnih cjevčica sastavljen samo od glavnih stanica (8).

1.1.3. **Bubrežni krvotok**

Bubreg je krvlju opskrbljen bubrežnom arterijom koja u bubreg ulazi u hilusu. Ona se dalje grana na interlobarne arterije od kojih se odvajaju arkuatne arterije. Od arkuatnih nastaju interlobularne arterije, a od njih grananjem nastaju aferentne arteriole koje ulaze u glomerul gdje tvore kapilarnu mrežu. Iz glomerularnih kapilara krv ulazi u eferentne arteriole koje ju odvođe u peritubularnu kapilarnu mrežu, a zatim krv ulazi u venski sustav i odlazi iz bubrega. Eferentne arteriole putem posebne peritubularne kapilarne mreže (*vasa recta*) opskrbljuju krvlju jukstamedularne nefrone (14).

1.1.4. Funkcije bubrega

Uloga je bubrega održati ravnotežu elektrolita i vode u tijelu što ostvaruju regulacijom izlučivanja metaboličkih produkata, elektrolita i vode urinom. Tako održavaju acidobazni status i stalan volumen krvi te reguliraju arterijski krvni tlak. Bubrezi imaju i endokrinu funkciju – proizvode hormone eritropoetin, renin te kalcitriol (2).

1.2. Koneksini i paneksini

Koneksini su transmembranski proteini koji formiraju kanale, takozvane tijesne spojeve (engl. *gap junction*) između susjednih stanica (15–17). Omogućavaju prijenos malih molekula kao što su sekundarni glasnici i ioni te se smatraju ključnim čimbenikom u međustaničnoj komunikaciji (16,18).

Paneksini su obitelj proteina koji strukturno i funkcionalno nalikuju na koneksine. Međutim, za razliku od koneksina, ne formiraju spojeve između pojedinih stanica, već tvore transmembranske kanale (19).

1.2.1. Koneksini

Brojna istraživanja na ljudima i glodavcima pokazala su da postoji više od 20 izoformi koneksina koje imaju značajnu homologiju među različitim vrstama. Naziv svake izoforme određen je na temelju njezine molekularne mase (npr. izoforma Cx40 označava koneksin s molekularnom masom od 40 kDa) (12,16).

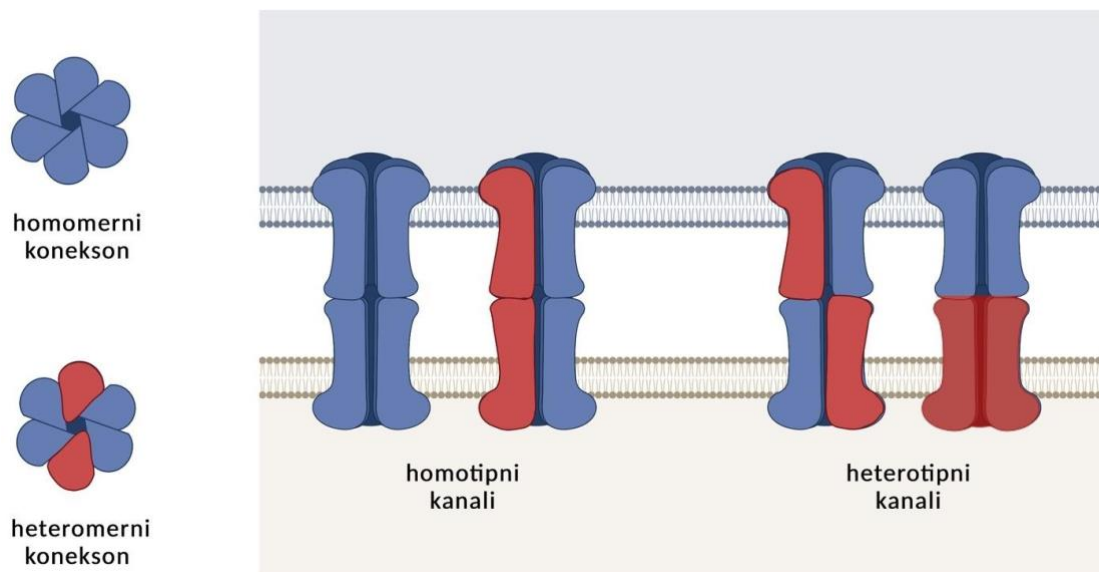
Koneksin je građen od četiri transmembranske domene povezane dvjema izvanstaničnim te jednom unutarstaničnom petljom. Uz to, unutar citoplazme su N i C završeci od kojih je C-kraj bitan za propusnost kanala (16,20). Poluživot koneksina kratak je u usporedbi s drugim membranskim proteinima te iznosi 3 – 5 sati. Njihova je brza izmjena jako bitna za učinkovit međustanični prijenos informacija tijesnim spojevima (20,21).

Svaki tijesni spoj sastavljen je od ukupno dvanaest koneksina: po šest koneksina pripada jednoj od dviju povezanih stanica te takvu strukturu zovemo konekson. Osim što grade tijesne spojeve, koneksini mogu tvoriti hemikanale preko kojih se odvija signalizacija između stanice

i njezinoga izvanstaničnog okoliša, odnosno neizravna komunikacija među stanicama. Tako se iz stanice oslobađaju parakrini glasnici kao što su adenozin trifosfat (ATP), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺), prostaglandin E2 i glutamat (12,17). Tek spajanjem dvaju koneksiona, pomoću izvanstaničnih petlji, nastaje tijesni spoj, kanal koji izravno povezuje citoplazme dviju stanica te omogućava prolaz molekulama molekularne mase do 1 kDa (16–18). Izravna komunikacija tijesnim spojevima jako je dinamična jer se ne gubi vrijeme na transportne mehanizme ili interakcije između liganda i receptora (17).

Koneksini se mogu fosforilirati pomoću kinaza i fosfataza na ostatcima tirozina ili serina/treonina. Fosforilacija može utjecati na provodljivost kanala te regulirati njihovo zatvaranje. Kakav će u konačnici biti učinak fosforilacije, ovisi o izoformi koneksina te o vrsti stanice u kojoj je koneksin izražen (21). Ovisno o tome jesu li građeni od istih ili različitih izoformi koneksina, koneksioni mogu biti homomerni ili heteromerni. Ako se povežu dva identična koneksiona (homomerna ili heteromerna), kanal koji formiraju jest homotipni. Heterotipni kanali nastaju između dvaju različitih koneksiona (homomernih ili heteromernih). Prema tome, samo su homomerni homotipni kanali homogeni, a svi ostali kanali su heterogeni (16,22,23).

Tijesni su spojevi ubikvitarni, prisutni su u gotovo svim vrstama stanica uz izuzetak eritrocita, trombocita, zrelih poprečnoprugastih mišićnih vlakana i spermatozoida. Također, reguliraju izmjenu raznih molekula među stanicama koje povezuju. Stoga je sasvim razumljivo da koneksini, kao njihove građevne jedinice, imaju važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima poput staničnoga rasta, proliferacije, angiogeneze, ali i nešto specifičnijim kao što su rast kostiju, razvoj matičnih stanica, srčana morfogeneza i neuronalna migracija (12).



Slika 3. Konekson je građen od šest jednakih ili različitih koneksina. Spajanjem dvaju identičnih homomernih ili heteromernih koneksiona nastaje homotipni kanal, dok heterotipni kanali nastaju spajanjem različitih (homomernih ili heteromernih) koneksiona. Izrađeno pomoću programa BioRender.

1.2.1.1. Koneksini u bubrežima

U bubrežima je prisutno devet različitih izoformi koneksina, i to Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Cx46 (16,17,24). Najzastupljeniji su Cx40, Cx43 i Cx45 te je veliki broj istraživanja usmjeren na otkrivanje njihove uloge, lokalizacije i izražaja u bubrežima različitih vrsta glodavaca, ali i ljudi (16,25).

Cx40 prisutan je najvećim dijelom u endotelnim stanicama, i to u bubrežnoj vaskulaturi i glomerulima. Izražen je i u mezangijskim stanicama glomerula i jukstaglomerularnim stanicama (16). Njegova uloga u regulaciji krvnoga tlaka opisana je u brojnim istraživanjima i smatra se najvažnijim bubrežnim koneksinom za održavanje stabilnoga krvnog tlaka (2,26). *Knock out* miševi za Cx40, osim što imaju povišen krvni tlak, pokazali su poremećaj autoregulacije bubrežnoga krvotoka. Budući da kod njih povišen krvni tlak nije potisnuo lučenje renina negativnom povratnom spregom, krvni se tlak nije održao u normalnim granicama (2).

U endotelnim stanicama bubrežne vaskulature, uz Cx40, prisutan je i Cx43, ali za razliku od njega, unutar glomerula nalazi se samo u podocitima. Nadalje, Cx43 dokazan je i u

proksimalnim kanalićima (16). Cx43 sudjeluje u održavanju normalnih vrijednosti arterijskoga krvnog tlaka. Na miševima je uočeno da globalna zamjena Cx43 s Cx32 dovodi do blažega smanjenja vrijednosti arterijskoga krvnog tlaka, što je povezano s poremećajem u funkcioniranju negativne povratne sprege izlučivanja renina putem mehanizma bubrežnih baroreceptora. Nadalje, delecija endotelnooga Cx43 u miševa dovodi do normotenzije, pa čak i hipotenzije, dok miševi s globalnom delecijom Cx43 umiru *in utero* (26).

Izražaj Cx45 opisan je u stanicama glatke muskulature aferentne i eferentne arteriole bubrega, intraglomerularnim i ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama, jukstaglomerularnim stanicama, podocitima te u distalnim kanalićima (16,27). Cx45 također sudjeluje u regulaciji krvnoga tlaka, što je dokazano u istraživanju na genetski modificiranim miševima sa smanjenim izražajem Cx45 u JGA-u. Kod tih je miševa opisan porast krvnoga tlaka uz povećanje aktivnosti renina u plazmi (2).

No, bez obzira na brojne studije u kojima se opisuje njihova lokalizacija unutar bubrega, podatci nisu jednoznačni te još uvijek nisu definirane ni sve njihove uloge na razini bubrega (16).

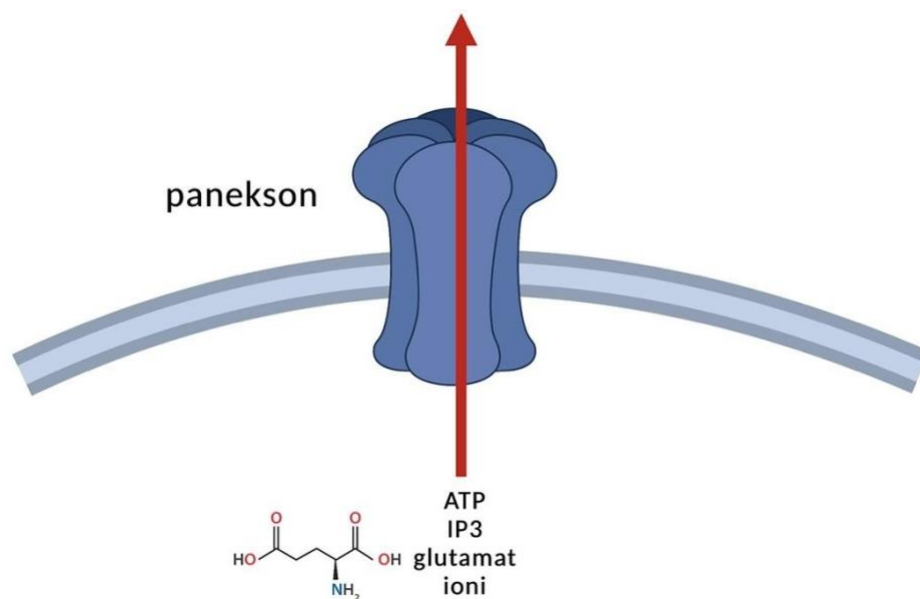
1.2.2. Paneksini

Paneksinski kanali odnosno paneksini nastaju oligomerizacijom šest do osam paneksina. Paneksini se sastoje od četiri transmembranske domene, dvije izvanstanične i jedne unutarstanične petlje te N i C kraja (19,28,29). Nalik su koneksonima te su propusni samo za molekule manje od 1 kDa (ioni, ATP, inozitol trifosfat – IP3, glutamat). Regulirajući otpuštanje ATP-a i drugih nukleotida iz stanica, sudjeluju u autokrinnoj i parakrinnoj signalizaciji među stanicama (28). Paneksinski kanali mogu se aktivirati različitim mehanizmima, primjerice mehaničkim stresom, visokim unutarstaničnim koncentracijama kalcija, aktivacijom purinergičkih i α 1-adrenergičkih receptora, čak i djelovanjem inzulina (28,30,31). Posttranslacijski se modificiraju N-glikozilacijom koja regulira staničnu lokalizaciju kanala (28).

Njihovu obitelj čine samo tri člana: Panx1, Panx2 i Panx3. Naziv su dobili prema redoslijedu kojim su otkriveni (19).

Panx1 je najznačajniji predstavnik skupine paneksina. Izražen je u brojnim tkivima i organima na epitelnim, endotelnim, stromalnim i imunskim stanicama te na neuronima. Zauzima središnje mjesto u brojnim fiziološkim i patološkim procesima uključujući unos glukoze u stanicu, uklanjanje apoptotskih stanica, ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu, neuropatsku bol i metastaziranje (31).

Za razliku od njega, Panx2 nalazi se samo u neuronima, prvenstveno središnjega živčanoga sustava, a Panx3 u koži, hrskavici, kostima, mozgu i bubrezima (31,32). Njihova je uloga usmjerena na neuronalni razvoj, odnosno na razvoj kože i kostura (31)



Slika 4. Paneksinski su kanali građeni od šest do osam paneksina. Paneksoni nalikuju koneksonima te su propusni samo za molekule manje od 1 kDa. Izrađeno pomoću programa BioRender.

1.2.2.1. Paneksini u bubrezima

U bubrezima je opisana prisutnost dvaju članova obitelji paneksina, Panx1 i Panx3 (2). Panx1 je najviše izražen na endotelu bubrežne vaskulature i u tubularnim segmentima (2,31). Međutim, opisan je i u stanicama glatke muskulature (28). Iako njegova uloga u bubrezima još nije točno definirana, razna istraživanja upućuju na njegovu važnost u regulaciji krvnoga tlaka (31,33). Budući da su kanali Panx1 u tubularnim segmentima smješteni na apikalnoj membrani

te reguliraju oslobađanje ATP-a, vrlo vjerojatno sudjeluju u transportu elektrolita (2). Pojedina istraživanja povezuju Panx1 sa šećernom bolesti i posljedičnim oštećenjima bubrega (32). Akutna ozljeda bubrega jedna je od komplikacija šećerne bolesti, a ako se ne liječi, napreduje do kroničnoga oštećenja bubrega. Rezultati eksperimentalnih studija ukazuju na ključnu ulogu Panx1 u razvoju akutne ozljede bubrega. Panx1 sudjeluje u čitavom procesu nastanka bubrežnoga oštećenja tako što pogoršava upalni proces. Inhibiranje njegovih kanala rezultira ublažavanjem nastalih oštećenja (32).

Prisutnost Panx3 dokazana je u endotelnim stanicama bubrežnih arteriola i glomerula te čitavim JGA-om. Upravo zbog prisutnosti Panx3 unutar JGA-a, vrlo je vjerojatno da sudjeluje u regulaciji krvnoga tlaka (2).

1.3. Šećerna bolest

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*, DM) kronični je metabolički poremećaj karakteriziran dugotrajnom hiperglikemijom, koji dovodi do poremećaja u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina te uzrokuje oštećenja brojnih tkiva i organa (34). Prema procjenama broj osoba oboljelih od DM-a do 2045. godine porast će na 693 milijuna, što je povećanje za više od 50 % u usporedbi s 2017. godinom (35).

Američko dijabetološko udruženje (engl. *American Diabetes Association*, ADA) klasificiralo je DM u četiri skupine:

- 1) šećerna bolest tipa 1 (DM1)
- 2) šećerna bolest tipa 2 (DM2)
- 3) gestacijska šećerna bolest (engl. *gestation diabetes mellitus*, GDM)
- 4) posebni tipovi šećerne bolesti (36).

1.3.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 autoimuna je bolest koja se pojavljuje u genetski predisponiranih osoba, najvjerojatnije kao posljedica djelovanja čimbenika iz okoliša (34,37). Virusi se smatraju jednim od mogućih okidača za razvoj bolesti (37,38).

Postoji snažna povezanost između DM1 i HLA-sustava (engl. *human leukocyte antigen*), i to gena DQA i DQB. Aleli HLA-DR/DQ mogu biti predisponirajući za razvoj bolesti ili pak djelovati protektivno (36). Posljedično, neke od oboljelih osoba uz DM1 imaju visoku učestalost drugih autoimunih bolesti kao što su Hashimotov tireoiditis, Addisonova bolest, perniciozna anemija te vitiligo jer se i njihovo nasljeđivanje povezuje s HLA sustavom (39). Budući da je bolest autoimuna, u krvi osoba oboljelih od DM1 mogu se naći autoprotutijela usmjerena na razne autoantigene u gušterači: Langerhansovi otočići (engl. *islet cell autoantigen* – ICA), dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase* – GAD), inzulin, tirozin-fosfataza IA-2 i IA-2 β (36).

Šećerna bolest tipa 1 obično započinje u djetinjstvu i tijekom adolescencije, odnosno u ranoj odrasloj dobi (37). Karakteristika je DM1 imunološko, stanicama posredovano oštećenje beta-stanica Langerhansovih otočića u gušterači. Aktivirani CD4 i CD8 T limfociti uništavaju beta-stanice uz makrofage koji pridonose oštećenju. S vremenom se proizvodnja inzulina smanjuje sve do uništenja beta-stanica i apsolutnoga manjka inzulina (34,37).

U oboljelih najčešći simptomi koji se pojavljuju uključuju polidipsiju, poliuriju i polifagiju. Osobe s dijagnozom DM1 gube na težini, osjećaju umor i slabost (39).

Ovoj skupini pripada i latentna autoimuna šećerna bolest odraslih (engl. *latent autoimmune diabetes in adults*, LADA) kod koje oštećenje beta-stanica u gušterači napreduje sporije te se može zamijeniti za DM2 (34,38). Mali postotak osoba oboljelih od DM1 ima trajni nedostatak inzulina, ali bez dokazanoga autoimunog oštećenja beta-stanica gušterače (36). Te osobe uglavnom potječu iz Azije i Afrike (36,38).

Liječenje osoba oboljelih od DM1 svodi se na doživotnu terapiju inzulinom (39).

1.3.2. Šećerna bolest tipa 2

Šećerna bolest tipa 2 najčešći je oblik DM-a, s 90 – 95 % oboljelih (36). Za nju je karakteristična inzulinska rezistencija, odnosno kombinacija relativnoga manjka inzulina i neosjetljivosti stanica na inzulin (34,37).

Bolest je genetska: velik broj gena sudjeluje u njezinoj patogenezi, od kojih dio još uvijek nije otkriven. Produkti nekih od poznatih gena sudjeluju u regulaciji lučenja inzulina, djelovanju inzulina unutar stanica, proizvodnji inzulinskih receptora ili reguliraju proizvodnju enzima koji su bitni u ovim procesima (39). Uz gene je vrlo važan utjecaj i okolišnih čimbenika kao što su sjedilački način života i prehrana bogata mastima i jednostavnim šećerima (40). Šećerna bolest tipa 2 povezana je s debljinom, iako otprilike 15 % bijelaca s tim tipom DM-a nije pretilo (34). Bolest je učestalija nakon 40-e godine, ali se u posljednje vrijeme pojavljuje u mlađih ljudi zbog porasta broja pretilih osoba u tim dobnim skupinama (38).

U početku simptomi nisu previše specifični te ih se često zanemaruje. Bolesnici se mogu tužiti na zamagljen vid i sporije cijeljenje rana. Osjećaju trnce u šakama i stopalima te imaju češće infekcije mokraćnoga mjehura i kože, dok su žene sklonije vaginalnim infekcijama (37).

U prvoj je liniji liječenja promjena načina života koja uključuje regulaciju tjelesne težine, pravilnu prehranu i tjelesnu aktivnost. Ako se uz sve navedene mjere ne postigne kontrola bolesti, primjenjuju se lijekovi. Od lijekova se primjenjuju različite vrste oralnih hipoglikemika te inzulinski pripravci (37).

1.3.3. Gestacijska šećerna bolest

Dijagnoza GDM-a postavlja se u žena kod kojih u trudnoći postoje povišene vrijednosti glukoze u krvi, a koje nemaju prethodno dijagnosticiran DM (38). Za ovaj oblik DM-a karakteristično je pojavljivanje tijekom trudnoće zbog fiziološke inzulinske rezistencije potaknute djelovanjem humanoga placentalnog laktogena u žena koje imaju genetsku sklonost za disfunkciju beta-stanica (34).

Gestacijska šećerna bolest povećava rizik od smrtnoga ishoda za majku i dijete te je povezana s kongenitalnim malformacijama, intrauterinim zastojem rasta, makrosomijom, prijevremenim porodom i mrtvorodenosti (37–39).

1.3.4. Posebni tipovi šećerne bolesti

U posljednju skupinu ubrajaju se monogeniski oblici DM-a, DM uzrokovan lijekovima i kemikalijama te DM nastao zbog poremećaja egzokrinoga dijela gušterače (cistična fibroza, pankreatitis) (36).

Monogenском obliku DM-a pripada MODY (engl. *Maturity Onset Diabetes of the Young*). To je heterogena skupina autosomno dominantnih poremećaja uzrokovana mutacijama najmanje trinaest različitih gena (34,36). Većina je mutiranih gena bitna za razvoj, funkciju i diferencijaciju beta-stanica gušterače. Produkti pojedinih mutiranih gena djeluju kao senzori za glukozu, a opisana je i mutacija inzulinskoga gena (34). Najčešći tip je MODY3, s otprilike 70 % oboljelih (37). U skupinu monogeniskih ubraja se i neonatalni oblik DM-a koji se pojavljuje prije navršenih šest mjeseci života, a može biti prolazan ili trajan (34).

1.3.5. Dijagnoza šećerne bolesti

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) kriteriji za dijagnozu DM-a jesu:

1. vrijednost glukoze u plazmi, u bilo kojem mjerenju, veća je ili jednaka 11,1 mmol/L
2. vrijednost glukoze u plazmi natašte (engl. *fasting plasma glucose*, FPG) veća je ili jednaka 7 mmol/L
3. vrijednost glukoze u plazmi veća je ili jednaka 11,1 mmol/L dva sata nakon uzimanja 75 g glukoze rastopljene u vodi, u testu oralnoga opterećenja glukozom (engl. *oral glucose tolerance test*, OGTT)
4. vrijednost glikoziliranoga hemoglobina (HgbA1c) veća je ili jednaka 6,5 %, odnosno 48 mmol/mol (34,37).

U štakorskim modelima DM-a za procjenu tolerancije glukoze uglavnom se koristi intraperitonealni test tolerancije glukoze (engl. *intraperitoneal glucose tolerance test*, IPGTT) umjesto OGTT-a (41).

1.3.6. Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije koje susrećemo u oboljelih od DM-a mogu se podijeliti na akutne i kronične. Skupini akutnih komplikacija pripadaju dijabetička ketoacidoza, hiperglikemijsko hiperosmolarno stanje, hipoglikemija i laktacidoza (42).

Dijabetička ketoacidoza i hiperglikemijsko hiperosmolarno stanje nastaju kada postoji neravnoteža između inzulina i kontraregulatornih hormona kao što su kateholamini, kortizol, glukagon i hormon rasta. Razine inzulina u apsolutnom su ili relativnom manjku u odnosu na povišene razine navedenih hormona. Kao akutne komplikacije pojavljuju se u oboljelih od DM1 i DM2 (42). Kod dijabetičke ketoacidoze nastupa karakterističan trijas: hiperglikemija, ketoza i metabolička acidoza (43). Hiperglikemijsko hiperosmolarno stanje karakterizirano je hiperglikemijom uz povišenu serumsku osmolarnost, ali bez znakova acidoze i ketoze (42).

Hipoglikemija je najčešća akutna komplikacija te je glavni ograničavajući čimbenik u kontroli razine glukoze u oboljelih od DM-a. Može uzrokovati ishemijska i neurološka oštećenja te aritmije (44). Američko dijabetološko udruženje definiralo je hipoglikemiju kao bilo koju vrijednost glukoze izmjerenu u plazmi koja je niža od 3,9 mmol/l (42). Karakteristični simptomi hipoglikemije uključuju znojenje, palpitacije, tahikardiju, bljedilo i drhtavicu te smetnje vida i govora, smetenost, vrtoglavicu i glavobolju (45).

Laktacidoza se pojavljuje u svim stanjima u kojima dolazi do smanjene perfuzije tkiva i organa s posljedičnom hipoksijom. Nastaje u stanjima šoka, sepse, intoksikacije lijekovima, u osoba oboljelih od malignih bolesti te kod teške astme zbog mišićne hiperaktivnosti. Rizik nastanka laktacidoze, koji je povezan s terapijom metforminom, izrazito je nizak s tek 0,03 – 0,06 na 1000 oboljelih od DM-a godišnje (46).

Šećerna bolest uzrokuje oštećenja velikih i malih krvnih žila. Iako su oštećenja izražena na makrovaskularnom sustavu, i to na koronarnim i cerebrovaskularnim arterijama, glavni uzrok smrtnosti u osoba s DM-om – oštećenja mikrovaskulature – ipak su češća (35). U skupinu mikrovaskularnih komplikacija ubrajaju se dijabetička retinopatija, neuropatija i nefropatija (35,37). Mehanizam nastanka oštećenja krvnih žila još uvijek nije detaljno objašnjen, ali je poznato da visoke razine glukoze povećavaju proizvodnju slobodnih kisikovih radikala koji, mijenjajući nizvodne signalne puteve, dovode do oštećenja vaskulature (35).

Dijabetička retinopatija vodeći je uzrok sljepoće u mnogim razvijenim zemljama te predstavlja značajan društveni problem jer pogađa upravo radno sposobnu populaciju ljudi (između 20. i 74. godine života). Pojavljuje se u otprilike trećine oboljelih od DM-a te je povezana s povećanim rizikom od cerebrovaskularnog infarkta, koronarne bolesti i zatajenja srca (47).

Dijabetička neuropatija dovodi do oštećenja perifernoga i autonomnoga živčanog sustava. Najčešće se manifestira u obliku distalne simetrične polineuropatije s izraženim senzoričkim tegobama, a napredovanjem bolesti javljaju se i motorički simptomi. Autonomna disfunkcija odražava se prvenstveno na gastrointestinalnom i genitourinarnom sustavu (48).

1.3.6.1. *Dijabetička nefropatija*

U razvijenim zemljama dijabetička nefropatija (DN) vodeći je uzrok terminalnoga stadija kronične bolesti bubrega (KBB) te je najčešći razlog za transplantaciju bubrega (37). Napredovanje DN-a odvija se od početne faze glomerularne hipertrofije i hiperfiltracije nakon kojeg se javlja upala glomerula i tubulointersticijskoga područja. Postupno se apoptozom smanjuje broj stanica, nakupljaju se proteini ekstracelularnoga matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM), nastupa zatajenje bubrega praćeno progresivnom glomerulosklerozom i tubulointersticijskom fibrozom (49,50). Napredovanje DN-a klinički se očituje rastućom albuminurijom uz postupno smanjenje stope glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR) (50). Treba uzeti u obzir da albuminuriju, koja se često koristi za procjenu progresije bolesti, nemaju svi bolesnici s DN-om i zatajenjem bubrežne funkcije (51).

Zlatni je standard za postavljanje konačne dijagnoze DN-a biopsija bubrega koja u oboljelih od DM-a nije indicirana jer je neopravdan rizik samoga postupka (52). Zato se dijagnoza postavlja na temelju dvaju kliničkih kriterija – albuminurije i procijenjene stope glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR). Vrijednost eGFR-a određuje se na temelju koncentracije kreatinina u serumu, a u obzir se uzimaju dob, spol i rasa (35). Prema Cockcroft-Gaultovoj jednadžbi iz 1976. godine umjesto rase uzimala se u obzir težina bolesnika. Međutim, danas se primjenjuje samo u svrhu prilagodbe doze lijekova jer nije toliko precizna u određivanju eGFR-a čije su vrijednosti blizu normalnih granica (53).

Ako je potreban precizniji izračun eGFR-a u osoba s poremećajem u proizvodnji ili metaboliziranju kreatinina, u jednadžbi se uz kreatinin koristi vrijednost cistatina C. To su

prvenstveno osobe s izrazito visokom ili niskom mišićnom masom, s amputiranim udovima, na prehrani bogatoj proteinima ili one koje koriste lijekove koji ometaju tubularnu sekreciju kreatinina (54).

U većine oboljelih od DN-a eGFR je snižen te iznosi manje od 60 ml/min/1,73 m² (55). Mikroalbuminurija je definirana kada je količina albumina u urinu veća od 30 mg u 24 sata, odnosno kada je omjer albumina i kreatinina (engl. *albumin to creatinine ratio*, ACR) u urinu veći od 30 mg/g (52,55).

Međutim, u kliničkoj praksi dijagnosticiranje DN-a temelji se na isključivanju drugih mogućih uzroka albuminurije te je za postavljanje dijagnoze potrebno zadovoljiti barem kriterij mikroalbuminurije, i to u onih osoba koje posljednjih pet godina boluju od DM-a (52).

Lezije koje se mogu vidjeti u bubrezima oboljelih od DN-a: zadebljanje GBM-a i proširenje mezangija (9).

Prema patološkoj klasifikaciji DN možemo podijeliti u četiri stadija od kojih svaki ima karakterističnu histološku sliku glomerula:

I – izolirano zadebljanje GBM-a dokazano elektronskim mikroskopom

Ia – blago proširenje mezangija vidljivo u više od 25 % promatranoga mezangija

Ib – teško proširenje mezangija vidljivo u više od 25 % promatranoga mezangija

III – nodularna skleroza uz tipične Kimmelstiel-Wilsonove lezije (fokalne okrugle ili ovalne lezije unutar mezangija građene od hijalinoga acelularnog materijala)

IV – globalna glomeruloskleroza veća od 50 % (56,57).

Budući da nema nikakve razlike u histološkoj slici DN-a, u oboljelih od DM1 i DM2, inzulin zasigurno nije značajan čimbenik koji pridonosi opisanim patološkim promjenama u bubrezima (58).

Osim glomerula u DN-u, oštećenjem su zahvaćena i ekstraglomerularna područja. U tubulointercijiju susrećemo atrofiju tubula, upalu intersticija i tubulointercijijsku fibrozu. Upravo se stupanj tubulointercijijske fibroze, a ne brojnost i vrsta glomerularnih lezija, smatra glavnim prediktivnim čimbenikom za progresivno opadanje bubrežne funkcije (51,59). Na krvnim žilama vidljiva je arterioskleroza te hijalinoza aferentne i eferentne arteriole. Hijalinoza eferentne arteriole karakteristična je za DN te ga razlikuje od hipertenzivne nefropatije (51,56).

Nije sporno da DN pokazuje patološku raznolikost te utječe na sve strukture u bubrežima. Zato je ključno prepoznavanje tih lezija za prevenciju i sprječavanje napredovanja DN-a (51).

Štakorski model koji u potpunosti prikazuje sve opisane patološke promjene karakteristične za DN još uvijek nije dostupan. Dostupni modeli, kao što su streptozotocinom (STZ) izazvan DM1 te modeli DM2, na temelju uočenih ranih glomerularnih lezija (zadebljavanje GBM, proširenje mezangija), mogu biti korisni u proučavanju ranih stadija DN-a. Međutim, njihovo je ograničenje u tome što ne prikazuju uznapredovale patološke promjene u bubrežima štakora kao što su Kimmelstiel-Wilsonove lezije (59).

Hiperglikemija pokreće proizvodnju slobodnih kisikovih radikala što je karakteristično za sve mikrovaskularne komplikacije DM-a (35). Kod DN-a slobodni kisikovi radikali nastali aktivacijom protein kinaze C (PKC) dovode do disfunkcije endotela (58). Upravo glomerularna endotelna disfunkcija dovodi do oštećenja glomerularne filtracijske barijere i pojave mikroalbuminurije, što je ujedno i rani klinički pokazatelj DN-a (60). Disfunkcija endotela uzrokuje smanjenu sintezu dušikova monoksida te se povezuje s proširenjem mezangija i oštećenjima podocita (58,60). Oštećeni podociti potaknuti su na proizvodnju proteaza, citokina kao i proteina ECM. Svi ti procesi pridonose zadebljavanju GBM-a (61).

U glomerulima, uz podocyte, epitelnim stanicama pripadaju i glomerularne PEC-e koje oblažu unutrašnju površinu parijetalnog lista BC-a (10). Holderied i suradnici dokazali su da kod bolesnika s DN-om dolazi do njihove aktivacije i posljedičnoga povećanja proizvodnje proteina ECM. Tako PEC na istovjetan način dovodi do zadebljavanja BC-a (58).

1.3.7. Koneksini i paneksini u šećernoj bolesti

Koneksini sudjeluju u patogenezi DM1 i DM2 te u patogenezi njenih makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija (17). Njihova je uloga vidljiva na razini brojnih stanica koje su važne za nastanak i razvoj DM-a, uključujući beta-stanice gušterače, endotelne i glatke mišićne stanice krvnih žila te hepatocite (21).

U DM-u je narušen precizan mehanizam međustanične komunikacije što se odražava na promjenama u izražaju, lokalizaciji ili funkciji koneksina (17,18). Visoke koncentracije glukoze dovode do smanjene komunikacije između endotelnih i glatkih mišićnih stanica u krvnim

žilama (21). U bubrezima dijabetičnih miševa uočeno je da eferentna arteriola ima smanjeni izražaj Cx43 u endotelnim stanicama, što bi moglo utjecati na povećanje intraglomerularnoga kapilarnog tlaka i oštećenja kapilara u DM-u (16,62). U glomerularnim mezangijskim stanicama pod utjecajem visoke koncentracije glukoze dolazi do smanjenja izražaja Cx43, što je povezano s hipertrofijom i starenjem tih stanica (63). Uz starenje povezuje se i smanjen izražaj Cx43 u stanicama kortikalnih kanalića u dijabetičnih štakora na modelu DM1 (64). U dijabetičnih štakora na modelu DM2 dokazan je poremećaj međustanične komunikacije na razini JGA-a, uz povećanu fosforilaciju Cx43 i smanjenu proizvodnju Cx40 i Cx43, a posebno Cx37 u stanicama koje luče renin (65). Na bioptatima bubrega oboljelih od DM2 uočen je smanjen izražaj Cx43 u podocitima. Takvo smanjenje izražaja povezano je s pogoršanjem DN-a, odnosno smanjenjem bubrežne funkcije (66). Pod utjecajem visoke koncentracije glukoze na štakorskim mikrovaskularnim endotelnim stanicama opisan je smanjeni izražaj Cx43, uz posljedično smanjenje aktivnosti tijesnih spojeva i uz poremećaj međustanične komunikacije (67).

Na mišjem modelu dokazano je da gubitak Cx36 u beta-stanicama Langerhansovih otočića dovodi do poremećaja u izlučivanju inzulina, uz nemogućnost njegovoga pulsirajućega otpuštanja, što je karakteristično za DM2. Nadalje, miševi koji ne izražavaju Cx36, osjetljiviji su na citotoksične učinke STZ-a, njihove se beta-stanice lako uništavaju te vrlo brzo nastupa eksperimentalni DM1 (21).

Paneksini se također povezuju s patogenezom DM-a. Panx1 je važan čimbenik u nastanku inzulinske rezistencije. Potvrđeno je da miševi na prehrani s visokim udjelom masti (engl. *highfat diet*, HFD), s genetskim nedostatkom Panx1 u adipocitima, razvijaju inzulinsku rezistenciju. Uz to je dokazano da je izražaj Panx1 povećan u visceralnom masnom tkivu pretilih osoba te je povezan sa stupnjem inzulinske rezistencije. Inhibicijom Panx1 kanala smanjuje se, o inzulinu ovisan, unos glukoze u stanice te se pogoršava inzulinska rezistencija (30). Panx1 prisutan je u beta-stanicama gušterače u kojima djeluje kao dodatni mehanizam otpuštanja ATP-a izvan stanice tijekom egzocitoze inzulina. Tako se povećava oslobađanje inzulina, što bi se moglo iskoristiti i u terapijskom pristupu oboljelima od DM-a (68).

Panx2 također je prisutan u beta-stanicama gušterače. U istraživanju na mišjem modelu DM1 dokazano je da njegov nedostatak doprinosi uništavanju beta-stanica te smanjuje oslobađanje inzulina (69).

1.4. Kronična bolest bubrega

Kronična bolest bubrega obilježena je ireverzibilnim oštećenjem nefrona, prisutna je u otprilike 14 % svjetske populacije te je jedan od važnijih globalnih javnozdravstvenih problema (70,71). *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* organizacija (KDIGO) donijela je 2012. godine smjernice u kojima je KBB definiran kao oštećenje strukture ili funkcije bubrega koje traje duže od tri mjeseca. U parametre strukturnoga oštećenja bubrega spadaju albuminurija, patološki nalaz sedimenta urina, poremećaj elektrolita, bubrežna oštećenja otkrivena histološkim pregledom bubrega, strukturni poremećaji bubrega otkriveni nekom od dijagnostičkih pretraga te transplantacija bubrega u povijesti bolesti. Poremećaj bubrežne funkcije može se uočiti na temelju vrijednosti eGFR-a koji je u KBB-u manja od 60 mL/min/1,73 m² (72).

Različite bolesti dovode do razvoja KBB-a. U razvijenim su zemljama najznačajnije DM, arterijska hipertenzija i glomerulonefritis. Među ostalima su uzrocima razni ishemijski i imunološki čimbenici te toksična oštećenja bubrega (54,73). Nasljedne bolesti, kao što je policistična bolest bubrega i Alportov sindrom te kongenitalne malformacije, također se mogu svrstati u češće uzročnike KBB-a (70).

U KBB-u oštećenjem može biti zahvaćen bilo koji dio nefrona – glomeruli, tubuli, intersticijsko područje te krvne žile. Svi patološki mehanizmi koji dovode do oštećenja tih struktura potiču stanje kronične upale (73). U glomerulima transformirajući čimbenik rasta $\beta 1$ (engl. *transforming growth factor $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$) dovodi do pretvorbe mezangijskih stanica u nezrele mezangioblaste koji proizvode proteine ECM-a te tako pridonose proširenju mezangija i glomerulosklerozi (74). Hiperglikemija djeluje izravno na stanice proksimalnih kanalića koje potiče na sekreciju TGF- $\beta 1$. To dovodi do epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) tubularnih stanica u miofibroblaste (28). Uz to, različiti kemokini privlače upalne stanice u bubrežni intersticij te pokreću interakciju s intersticijskim miofibroblastima (74). Miofibroblasti, putem povećane proizvodnje ECM-a, pridonose nastanku tubulointersticijske fibroze uz posljedično smanjenje bubrežne funkcije (73).

Kronična bolest bubrega dugotrajna je bolest koja postupno napreduje od blažega smanjenja GFR-a pa sve do potpunoga zatajenja bubrežne funkcije (75). Preporuka je da se KBB klasificira na temelju njezinoga uzroka, veličine GFR-a i albuminurije (72).

Uzrok KBB ponekad je teško odrediti pa se uglavnom definira prema prisutnosti ili odsutnosti sistemske bolesti, odnosno prema anatomske lokalizaciji bubrežnoga oštećenja. U sistemske bolesti pripadaju šećerna bolest, autoimuni poremećaji, kronične infekcije, maligne bolesti te genetske bolesti koje zahvaćaju i druge organe. Prema anatomske lokalizaciji dijelimo ih na glomerularne, tubulointersticijske, vaskularne te cistične/kongenitalne bolesti (54).

Prema veličini eGFR-a postoji pet kategorija koje su gotovo jednake prethodnoj podjeli KBB-a na stupnjeve. Jedina je razlika u podjeli nekadašnjega stupnja tri, podijeljenoga na dvije potkategorije (72).

Kategorije prema eGFR-u su:

- G1 – uredan ili povećan eGFR ($> 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$)
- G2 – blago smanjenje eGFR ($60 - 89 \text{ ml/min/1,73 m}^2$)
- G3a – blago do umjereno smanjenje eGFR-a ($45 - 59 \text{ ml/min/1,73 m}^2$)
- G3b – umjereno do teško smanjenje eGFR-a ($30 - 44 \text{ ml/min/1,73 m}^2$)
- G4 – teško smanjenje eGFR-a ($15 - 29 \text{ ml/min/1,73 m}^2$)
- G5 – zatajenje bubrega (eGFR $< 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) (70,74).

Albuminurija je podijeljena u tri kategorije, ovisno o vrijednostima albumina u 24-satnom urinu:

- A1 – $< 30 \text{ mg/dan}$
- A2 – $30 - 300 \text{ mg/dan}$
- A3 – $> 300 \text{ mg/dan}$ (72).

Smjernice savjetuju da se svake godine obavi probir na KBB-u kod oboljelih od šećerne bolesti i hipertenzije. Probir uključuje određivanje serumskoga kreatinina, procjenu GFR-a na temelju vrijednosti serumskoga kreatinina, mjerenje ACR-a te analizu urina. Budući da ACR ima veću osjetljivost za otkrivanje albuminurije niskoga stupnja, sve se više koristi u početnoj dijagnostičkoj obradi od analize 24-satnoga urina. Uz to uvijek postoji velika mogućnost neadekvatnoga prikupljanja 24-satnog uzorka urina (53).

S obzirom na vrijednosti ACR-a, albuminuriju možemo svrstati u tri kategorije:

A1 – ACR < 30 mg/g

A2 – ACR 30 – 300 mg/g

A3 – ACR > 300 mg/g (72).

U početnoj fazi KBB je asimptomatski, tek u rijetkih se javljaju simptomi kao što je hematurija, pjenušavi urin (znak albuminurije), nokturija ili oligurija (54). S napredovanjem bolesti, simptomi su sve izraženiji, a oboljeli se tuže na umor, mučninu i povraćanje, gubitak apetita i svrbež kože. Dolazi do trzanja i grčeva u mišićima te nastanka perifernih edema (54,74,75).

Najčešća je komplikacija KBB-a anemija (54). Nastaje prvenstveno zbog smanjenoga lučenja eritropoetina, dok manjak željeza, vitamina B12 i folne kiseline također pridonose njenom razvoju (70,74). Zbog poremećenoga metabolizma vitamina D, kalcija i fosfata, nastaje bolest kostiju (74).

Terapijski pristup oboljelima od KBB-a svodi se na usporavanje napredovanja bolesti uz liječenje komplikacija (70).

1.5. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom (MS) ili sindrom X prvi put je opisao Reaven 1988. godine kao skup čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti (76,77). Svjetska zdravstvena organizacija 1999. godine definirala je MS kao skup metaboličkih poremećaja koji je karakteriziran inzulinskom rezistencijom koja se očituje poremećenom tolerancijom glukoze (engl. *impaired glucose tolerance*, IGT), poremećajem glukoze natašte (engl. *impaired fasting glucose*, IFG) ili DM2 uz prisutnost barem dvaju od sljedećih poremećaja: abdominalni tip pretilosti, hipertenzija, dislipidemija s povišenim vrijednostima triglicerida (engl. *triacylglycerol*, TAG) i sniženim vrijednostima HDL (engl. *high density lipoprotein*) kolesterola te mikroalbuminurija (78,79).

Uz WHO, definiciju MS-a postavili su EGIR (engl. *European Group for the study of Insuline Resistance*), NCEP:ATPIII (engl. *the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*), AACE (engl. *the American Association of Clinical Endocrinology*),

AHA/NHLBI (engl. *the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute*) i IDF (engl. *International Diabetes Federation*) (77–80).

Prema definiciji IDF-a iz 2005. godine za postavljanje dijagnoze ključna je prisutnost abdominalnoga tipa pretilosti uz bilo koja dva preostala kriterija: hiperglikemija natašte, hipertenzija ili dislipidemija (vrijednosti TAG-a, odnosno HDL kolesterola). Za definiranje abdominalne pretilosti, prema IDF-u, bitno je uzeti u obzir etničku pripadnost oboljeloga, tako da za Europljane opseg struka mora biti veći od 94 cm, a za Azijate veći od 90 cm (81). Za pripadnice ženskoga spola opseg struka mora biti veći od 80 cm, neovisno o pripadajućoj populaciji. Ako opseg struka nije poznat, abdominalni tip pretilosti može se procijeniti na temelju BMI-ja koji onda mora biti 30 i veći (79). Upravo je u tome razlika prema AHA/NHLBI definiciji MS-a koja ne uzima u obzir populacijske razlike prilikom mjerenja opsega struka. Također, za tu definiciju nije potrebno zadovoljiti kriterij abdominalne pretilosti, nego se uzimaju u obzir bilo koje tri spomenute sastavnice MS-a (78,82).

Svim definicijama MS-a zajedničko je prepoznavanje sastavnica, i to 1) pretilosti, abdominalnoga tipa pretilosti, odnosno pokazatelja inzulinske rezistencije, 2) poremećenoga metabolizma glukoze, 3) hipertenzije i 4) dislipidemije. Razlike su u načinu kako se pojedine sastavnice klinički određuju, a u nekim definicijama ključno je postojanje određene sastavnice kako bi se zadovoljila definicija MS-a (77). Da bi se postigla usuglašenost među različitim definicijama, 2009. godine doneseni su objedinjeni kriteriji za dijagnozu MS-a na temelju već ranije spomenutih definicija IDF-a i AHA/NHLBI-ja. Tako za postavljanje dijagnoze treba zadovoljiti bilo koja tri kriterija – povećan opseg struka (uz prilagodbu izmjerenih vrijednosti za određenu populaciju), povećane vrijednosti TAG-a, smanjene vrijednosti HDL kolesterola, hipertenzija te povišene vrijednosti glukoze natašte (79).

Tablica 1. Definicije metaboličkog sindroma

	WHO (1999.)	NCEP/ ATPIII (2001.)	IDF (2005.)	OBJEDINJENA DEFINICIJA (2009.)
DIJAGNOSTIČKI KRITERIJ	IFG/IGT/DM2 uz 2 preostala kriterija	najmanje 3 od navedenih kriterija	pretilost uz 2 preostala kriterija	najmanje 3 od navedenih kriterija
pretilost	omjer struk/bokovi > 0,9 M > 0,85 Ž ili BMI > 30 kg/m ²	opseg struka ≥ 102 cm M ≥ 88 cm Ž	opseg struka ≥ 94 cm M ≥ 90 cm (Azijati M) ≥ 80 cm Ž	opseg struka specifično za određenu populaciju i etničku skupinu
hiperglikemija	DM2 FPG > 6,1 mmol/L 2h OGTT > 7,7 mmol/L	DM2 FPG ≥ 6,1 mmol/L	DM2 FPG ≥ 5,6 mmol/L	FPG ≥ 5,6 mmol/L ili liječena
dislipidemija	HDL < 0,91 mmol/L M < 1 mmol/L Ž TAG ≥ 1,7 mmol/L	HDL < 1 mmol/L M < 1,3 mmol/L Ž TAG ≥ 1,69 mmol/L ili liječena	HDL < 1 mmol/L M < 1,3 mmol/L Ž TAG ≥ 1,7 mmol/L ili liječena	HDL < 1 mmol/L M < 1,3 mmol/L Ž TAG ≥ 1,7 mmol/L ili liječena
hipertenzija	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg ili liječena	≥ 130/85 mmHg ili liječena
dodatni kriterij	mikroalbuminurija ≥ 20 μg/min ACR ≥ 30 mg/g	/	/	/

M – muškarci, Ž – žene. Prilagođeno prema (77).

Inzulinska rezistencija bitan je čimbenik u patofiziologiji MS-a. To je stanje u kojem je smanjeno djelovanje inzulina u perifernim tkivima (80). Zbog toga beta-stanice gušterače počinju lučiti sve više inzulina kako bi se vrijednosti glukoze održale u normalnim granicama. Nastaje hiperinzulinemija koja s vremenom ne uspijeva održati normoglikemiju te se javlja IFG, IGT (predijabetes) te u konačnici DM (83).

Inzulinska je rezistencija često povezana s abdominalnim tipom pretilosti. Osobe ne moraju nužno biti pretile, ali su sklone nakupljanju visceralne masti (83). Visceralno masno tkivo razlikuje se od potkožnoga masnog tkiva po različitim izražaju gena (77). U istraživanju na

pretilim osobama dokazano je da je visceralna mast povezana s razvojem ateroskleroze, dislipidemije i inzulinske rezistencije, dok povezanost potkožnoga masnog tkiva nije bila značajna nakon prilagodbe rezultata s indeksom tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) (84). Upravo je zbog povećanja broja pretilih osoba incidencija MS-a u stalnom porastu, tako da u razvijenim zemljama iznosi otprilike 30 % (77,85). Metabolički sindrom izravno je povezan s razvojem KBB-a. Međutim, svaki od navedenih metaboličkih poremećaja u sklopu MS-a neovisan je čimbenik koji pridonosi oštećenju bubrega (75,86). Što je veći broj prisutnih poremećaja, to je mogućnost napredovanja bubrežnoga oštećenja i pogoršanja funkcije bubrega veća (76).

U razvoju MS-a uključeni su brojni patofiziološki procesi kao što je kronična upala, oksidativni stres, inzulinska rezistencija, ishemija, endotelna disfunkcija i povećana proizvodnja profibrotičkih čimbenika. Svi oni pridonose oštećenju bubrega kod KBB-a (75,87). Kronična upala povezana je s povišenim razinama proupalnih čimbenika kao što su C-reaktivni protein (CRP), tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), interleukin-6 (IL-6) te inhibitor aktivatora plazminogena-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1), uz smanjene razine protuupalnih čimbenika (88). Kod MS-a neki su od vidljivih znakova poremećaja funkcije bubrega mikroalbuminurija, proteinurija te smanjenje GFR-a (75). Patohistološki pregled bubrega u bolesnika s MS-om pokazao je veću učestalost tubularne atrofije, intersticijske fibroze, arterijske skleroze te globalne i segmentalne glomeruloskleroze u odnosu na bubrege osoba bez dokazanoga MS-a (75,76,87). Oštećenje bubrega povezano s MS-om nalikuje ranom stadiju DN-a koji je karakteriziran zadebljanjem GBM-a (56,81). Nadalje, uz spomenuto zadebljanje na razini glomerula, vrlo vjerojatno dolazi i do zadebljavanja BC-a (58).

Postoje razni životinjski modeli koji se koriste za istraživanje MS-a, a temelje se na prehrani s visokim udjelom masti ili visokim udjelom ugljikohidrata, odnosno njihovom kombinacijom (85). Od ugljikohidrata za indukciju MS-a prvenstveno se koriste fruktoza i saharoza. Prehrana s visokim udjelom fruktoze (engl. *high fructose diet*, HFrD) u glodavaca dovodi do inzulinske rezistencije i poremećaja tolerancije glukoze, a uz to povisuje vrijednosti arterijskoga krvnog tlaka i uzrokuje dislipidemiju. Iako neka istraživanja opisuju da dovodi do pretilosti, to još uvijek nije potvrđeno. Budući da je saharoza disaharid sastavljen od fruktoze i glukoze, dovodi do nastanka svih navedenih sastavnica MS-a na gotovo istovjetan način kao i sama fruktoza. U glodavaca se HFD prehrana može povezati s većinom metaboličkih

poremećaja koji su u sklopu MS-a. Međutim, takva prehrana ne dovodi do razvoja svih komplikacija MS-a te je dosta jednostavnija od prehrane koja u ljudi potiče razvoj MS-a. Zato se sve više za indukciju MS-a koristi kombinacija prehrane s visokim udjelom masti i visokim udjelom šećera (engl. *highfat high sugar diet*, HFHSD). Kao izvor masti najviše se koristi svinjska mast, goveđi loj, maslinovo ili kokosovo ulje, a od šećera fruktoza ili saharoza. U modelu prehrane s visokim udjelom masti i fruktoze (engl. *high fat high fructose diet*, HFHFrD) postotak fruktoze varira između 10 % i 60 % dok je postotak masti od 20 % do 60 %. Postotak saharoze u kombiniranom modelu može biti od 10 % do 30 %, a masti od 20 % do 40 % (89).

Terapijski pristup osobama s MS-om svodi se na promjenu načina života s izmjenom prehrambenih navika i povećanom tjelesnom aktivnošću, dok se kod nekih dodatno primjenjuju i farmakološke mjere (83). Farmakološki pristup uglavnom se temelji na nekoliko lijekova koji se mogu koristiti sami ili u kombinaciji, a uključuju lijekove kao što su statini, fibrati, diuretici, blokatori renin angiotenzinskoga sustava, lijekovi protiv pretilosti, metformin i agonisti glukagon sličnoga peptida-1 (engl. *glucagon-like-peptide-1*, GLP-1) (78,90).

1.5.1. Koneksini i paneksini u metaboličkom sindromu

Koneksini sudjeluju u patogenezi nekih sastavnica MS-a. Dokazano je da homozigotna mutacija Cx50 štiti hipertenzivne mužjake štakora od inzulinske rezistencije te dovodi do smanjenja visceralnoga masnog tkiva. Heterozigotna je mutacija povezana s povećanim vrijednostima TAG-a i smanjenim vrijednostima kolesterola (HDL, ukupni i LDL, engl. *low density lipoprotein*) (91).

Paneksini su također bitan faktor u razvoju MS-a. Osim već spomenute povezanosti između Panx1 i inzulinske rezistencije te pretilosti (30), dokazano je da Panx1 ima važnu ulogu u regulaciji vaskularnoga tonusa i krvnoga tlaka (92).

1.6. Terapijske mogućnosti u liječenju šećerne bolesti i metaboličkoga sindroma

Glavni je cilj liječenja DM-a uklanjanje smetnji te sprječavanje razvoja akutnih i kroničnih komplikacija bolesti. To se postiže kombinacijom pravilne prehrane i tjelesne aktivnosti kod svih bolesnika, a u pojedinim je ipak potrebna terapija peroralnim lijekovima ili inzulinom (93).

Liječenje MS-a usmjereno je na regulaciju pretilosti kao ključnoga metaboličkog poremećaja. Pravilna je prehrana, uz održavanje redovite tjelesne aktivnosti, najbitnije za smanjenje tjelesne težine. Ako su prisutne i druge sastavnice MS-a, primjenjuju se lijekovi, i to antihipertenzivi, hipolipemici ili hipoglikemici (80).

1.6.1. Polinezasićene masne kiseline

Masne su kiseline karboksilne kiseline s različitom duljinom ugljikovodičnoga (alifatskog) lanca koje sudjeluju u formiranju staničnih membrana, u sintezi ATP-a, prijenosu signala i u skladištenju energije (94).

Prema broju dvostrukih veza između dva ugljikova atoma dijele se na:

- 1) zasićene (engl. *saturated fatty acids*, SFA) – nemaju dvostruku vezu
- 2) mononezasićene (engl. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) – imaju jednu dvostruku vezu
- 3) polinezasićene (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) – imaju više od jedne dvostruke veze (94,95).

Nadalje, mogu se klasificirati na temelju duljine ugljikovodičnoga lanca te položaja prve dvostruke veze na metilnom kraju (96). S obzirom na smještaj prve dvostruke veze između ugljikovih atoma na metilnom kraju ugljikovodičnoga lanca, PUFA-e se dijele u dvije skupine; omega-3 (n-3) i omega-6 (n-6) masne kiseline (95,97). Dvostruka veza u omega-3 PUFA smještena je između trećega i četvrtoga atoma ugljika od metilnoga kraja, a u omega-6 između šestoga i sedmoga ugljikovog atoma (98). Alfa linolenska (ALA), eikozapentaenska (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA) ubrajaju se u skupinu n-3 PUFA, dok skupini n-6 PUFA pripadaju linolna (LA), arahidonska (AA) i dokozapentaenska kiselina (DPA) (99). Iako postoje strukturne sličnosti među njima, njihovi se biološki učinci uglavnom razlikuju (95). Nadalje, između članova skupine omega-3 i njihovih analoga iz skupine omega-6 masnih kiselina postoji natjecanje za različite enzime (94).

Sve SFA i MUFA mogu se sintetizirati *de novo*, dok se mogućnost sinteze PUFA-i razlikuju ovisno o pojedinom predstavniku skupine. ALA (n-3) i LA (n-6) imaju osamnaest ugljikovih atoma. Esencijalne su za ljudsku prehranu jer se ne mogu sintetizirati, nego se moraju unijeti hranom biljnoga podrijetla (sjemenke, orašasti plodovi i ulja). Većina biljnih ulja i sjemenki (suncokret, soja, kukuruz, repa, konoplja, mak) sadrži visok udio LA-e s tek malim

udjelom ALA-e. Glavni su izvori ALA-e lanene i chia sjemenke, orasi te zeleno lisnato povrće. AA, EPA i DHA mogu se u organizam unijeti konzumiranjem mesa (AA), odnosno plodova mora (EPA i DHA), ali se mogu i sintetizirati iz svojih osamnaest ugljikovih atoma dugačkih parnjaka pomoću elongaza i desaturaza. Upravo je zbog ograničenih izvora u hrani, unos n-3 PUFA u odnosu na n-6 PUFA uglavnom nedostatan (94,96,98).

Učinci su PUFA-i pleiotropni – djeluju izravno na funkciju endotela i proizvodnju citokina, a mogu utjecati na antioksidativnu enzimatiku aktivnost i ukupni antioksidativni status (100,101).

Unos n-3 PUFA-i smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i zloćudnih tumora. Njihovo blagotvorno djelovanje očituje se u nekim kroničnim metaboličkim bolestima kao što su DM, pretilost i osteoporoza te u kroničnim upalnim bolestima kao što su atopijski dermatitis i psorijaza (96,98). Smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti ujedno se smanjuje i glavni uzrok smrti u oboljelih od DM-a s KBB-om (101). Na temelju zapažanja brojnih istraživanja dokazano je da n-3 PUFA-e imaju brojne zaštitne uloge u oboljelih od DM-a – smanjuju inzulinsku rezistenciju, dovode do gubitka težine kod pretilih te sprječavaju razvoj pridruženih komplikacija kao što su aritmije i arterijska hipertenzija (100,102). Osim toga, blagotvorno djeluju na njihovu bubrežnu funkciju što se klinički očituje smanjenjem albuminurije i ublažavanjem strukturalnih oštećenja bubrega, glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze (101,103). U pozadini svih nabrojanih učinaka n-3 PUFA-i stoje ublažavanje upale, regulacija imunološkog odgovora i angiogeneze te smanjenje oksidativnog stresa (96,101).

Za razliku od n-3 PUFA, nema puno podataka o utjecaju prehrane bogate n-6 PUFA-ama na DM (100). Proupalna svojstva n-6 PUFA-a uključuju proizvodnju medijatora upale kao što su prostaglandini i leukotrieni. Oni nastaju od AA-e djelovanjem enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze te su ključni u upalnim procesima (97,99,100). Akutni upalni odgovor dio je obrane organizma te ima zaštitnu ulogu od raznih infekcija i ozljeda. Međutim, ako je upalni odgovor neprimjeren, prekomjeren i dugotrajan, može nastati nekontrolirano oštećenje tkiva, patološka stanja te bolesti. Tako se stvaraju idealni uvjeti za razvoj tumora, ateroskleroze i kardiovaskularne bolesti (96,104). N-6 PUFA-e dovode do povećanja oksidacijskoga stresa zbog postojanja dvostruke veze između šestoga i sedmog atoma ugljika od metilnoga kraja. Poznato je da ta veza može sudjelovati u stvaranju slobodnih kisikovih radikala (100). Također,

suprotno djelovanju n-3 PUFA-a, potiču razvoj inzulinske rezistencije, djeluju protrombotski, a povezuju se s kroničnom boli, kognitivnim oštećenjima i vazokonstrikcijom (96,97,99,102). Bez obzira na njihove relativno nepovoljne učinke, pojedina su istraživanja opisala blagotvorno djelovanje n-6 PUFA-a (100,104). Tako se njihov učinak na lipidnom profilu očitovao smanjenjem vrijednosti LDL-a uz povećanje vrijednosti HDL kolesterola (100). Nadalje, istraživanja su pokazala da se AA i LA mogu povezati i sa smanjenjem upale te da njihov povećani unos prehranom ne povećava koncentraciju brojnih upalnih čimbenika (104).

Poznato je da ravnoteža između DHA-e i AA-e, kao glavnih predstavnica n-3 i n-6 PUFA-a, utječe na svojstva membranskih proteina i signalnih puteva (105). Za prevenciju kroničnih i autoimunih bolesti preporučuje se prehrana u kojoj je omjer između n-6 i n-3 PUFA-a manji od četiri. Nažalost, zbog prekomjernoga unosa n-6 PUFA-a u razvijenim zemljama Europe i u SAD-u prosječan omjer je dosta veći, oko 15 (99,106).

Brojna su istraživanja koja pokazuju da prehrana bogata PUFA-ama utječe na međustaničnu komunikaciju. Dugotrajnija suplementacija s DHA-om u kulturi astrocita dovodi do povećanja kapaciteta spajanja tijesnim spojevima (105). Također, u *in vivo* istraživanju na hipertenzivnim štakorima dokazano je da prehrana obogaćena n-3 PUFA-ama utječe na izražaj u Cx43 u aorti (107), odnosno u srcu štakora u modelima DM2 (108) i dijabetičke kardiomiopatije (109). Nadalje, utvrđeno je da AA onemogućava oslobađanje ATP-a putem Panx1 kanala iz stanica mikroglije nakon ozljede živca te tako inhibira njihovu migraciju na mjesto oštećenja (110).

1.6.2. Metformin

Metformin je lijek izbora za peroralno liječenje oboljelih od DM2. Kod bolesnika s MS-om, koji su pretili te imaju poremećenu toleranciju glukoze, odnosno visoke koncentracije glukoze natašte, korist je metformina u prevenciji nastanka DM2 (50,83,85). Primjenjuje se u terapiji sindroma policističnih jajnika i GDM-a (111). Uz to, opisano je njegovo antitumorsko i neuroprotektivno djelovanje, kao i učinak protiv starenja (112).

Metformin pripada skupini bigvanida. Uz fenformin, koji je još jedan pripadnik bigvanidne skupine, razvio se od derivata gvanidina zvanoga galegin. Njega nalazimo u vrsti francuskoga jorgovana *Galega officinalis* (113).

Regulaciju povišenih vrijednosti glukoze u krvi ostvaruje smanjenjem glukoneogeneze u jetri te inhibiranjem apsorpcije glukoze u crijevima (114). Također, povećava staničnu osjetljivost na inzulin putem GLUT4 (engl. *glucose transporter 4*) posredovanoga unosa i iskorištavanja glukoze u perifernim tkivima (50,85,114). Dokazano je da potiče otpuštanje GLP-1 te tako poboljšava sekreciju inzulina i snižava razinu glukoze (115). Terapija metforminom smanjuje razinu TAG i LDL kolesterola te potiče gubitak težine u pretilih osoba (50).

Pri liječenju DM2 koristi se metformin kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim hipoglikemicima te inzulinom. Optimalna oralna doza metformina za većinu oboljelih iznosi 2 g dnevno (111), dok je maksimalna preporučena dnevna doza 3 g (113). U literaturi postoje podatci o eksperimentalnoj primjeni metformina kod štakora u vrlo širokom rasponu dnevnih doza – od 10 do 500 mg/kg ili čak i više (85,114,116,117).

Farmakokinetika metformina bitan je čimbenik za procjenu učinkovitosti lijeka, ali i za njegovu sigurnost (118). Prosječna oralna bioraspoloživost metformina iznosi otprilike 60 %. Budući da se ne metabolizira, izlučuje se nepromijenjen, izlučuje se urinom prvenstveno aktivnom tubularnom sekrecijom te manjim dijelom glomerularnom filtracijom (50,118). Metformin je hidrofilna baza pa je ograničena njegova pasivna difuzija kroz stanične membrane. Stoga su mu za membranski prijelaz potrebni prijenosnici (113). U tankom crijevu apsorpcija metformina posredovana je plazmamembranskim monoaminskim transporterom (PMAT), koji je smješten na luminalnoj strani enterocita (111). Uz njega vrlo važnu ulogu imaju organski kationski transporteri (engl. *organic cation transporter*, OCT), posebno OCT2, koji sudjeluju u bubrežnoj apsorpciji metformina, a smješteni su na bazolateralnoj membrani proksimalnih zavijenih kanalića. Metformin se izlučuje u urin putem prijenosnika MATE1 i MATE2 (engl. *multidrug and toxin extrusion*) (111). U bubrežima pretilih miševa, koji su hranjeni HFD-om, te na bioptatima bubrega pretilih osoba s bolesti minimalnih promjena (engl. *minimal change disease*) uočen je povećan izražaj OCT2 i OCT3 u odnosu na kontrolne skupine (119). Na štakorskim modelima utvrđeno je da izražaj OCT2 ovisi o spolu te je zbog djelovanja testosterona veći u mužjaka nego u ženki (118,119). Vrijeme poluživota metformina iznosi otprilike pet sati, i to nakon primjene višestrukih doza u bolesnika s dobrom bubrežnom funkcijom (113).

Metformin usmjerava metabolizam na anaerobne uvjete – smanjuje aktivnost enzima piruvat karboksilaze koji potiče daljnje metaboliziranje piruvata u procesu glukoneogeneze

(46). Tako dovodi do povećane pretvorbe piruvata u laktat, što u konačnici rezultira povećanom proizvodnjom mliječne kiseline (50). Upravo je zbog rizika od razvoja laktacidoze njegova primjena kontraindicirana u uznapredovalim fazama KBB-a, kada je vrijednost eGFR-a manja od 30 mL/min/1,73 m² (120). Rizik je time znatno smanjen, ali treba uzeti u obzir da se može povećati u slučajevima sistemske hipoksije, insuficijencije jetre ili predoziranja metforminom (46,121). Ipak, primjenom metformina u terapijskim dozama smanjena je incidencija laktacidoze te iznosi manje od tri slučaja na 100 000 oboljelih od DM-a koji su na terapiji metforminom godišnje (111).

Od nuspojava treba istaknuti gastrointestinalne smetnje (mučnina, povraćanje i proljev) koje se pojavljuju u otprilike 30 % osoba koje su na terapiji metforminom. Neke rjeđe nuspojave uključuju slabost, malaksalost, glavobolju, nelagodu u prsištu i rinitis (112).

Veliki broj kliničkih istraživanja pokazao je da metformin ima blagotvorno djelovanje na brojnim organima pri različitim oštećenjima i bolestima (121). Njegova je primjena povezana sa smanjenom smrtnošću u bolesnika s umjerenim i teškim stadijem KBB-a, kongestivnim zatajenjem srca te kroničnim zatajenjem jetre (122). Metformin smanjuje rast, preživljavanje te metastaziranje tumorskih stanica, što je dokazano u karcinomu dojke, pluća, bubrega, jetre, debeloga crijeva, endometrija i gušterače (115). U osoba oboljelih od DM-a ne samo da regulira povišene vrijednosti glukoze već i smanjuje učestalost makrovaskularnih komplikacija kao što su infarkt miokarda, cerebrovaskularni inzult i bolesti perifernih krvnih žila (50). Istraživanje na velikoj populaciji oboljelih od DM2 iz Velike Britanije (n = 469 688) pokazalo je da korištenje metformina značajno smanjuje rizik razvoja sljepoće, amputacije i teškoga zatajenja bubrega (123). U štakorskom modelu DM2 izazvanom HFD-om, uz niske doze STZ-a, dokazano je da metformin poboljšava nastale bubrežne lezije (proširenje Bowmanovoga prostora, vakuolarnu degeneraciju, dilataciju tubula) te smanjuje debljinu GBM-a (114). Metformin je kod miševa s MS-om i oštećenom funkcijom bubrega spriječio nastanak glomerularnih lezija kao što su oštećenje podocita, proširenje mezangija i glomeruloskleroza, što se klinički očitovalo smanjenjem mikroalbuminurije (88). Metformin ublažava stupanj tubulointersticijske fibroze smanjujući proizvodnju proteina ECM i depozita kolagena. To je dokazano na različitim *in vitro* i životinjskim modelima kroničnoga oštećenja bubrega (unilateralna ureteralna opstrukcija – UUO, ishemijsko-reperfuzijska ozljeda) (121). U mehanizme koji se smatraju pozadinom njegovoga zaštitnog djelovanja u bubrezima ubrajaju se smanjenje oksidativnoga stresa i upale te ublažavanje stresa endoplazmatskoga retikuluma (ER) (88,114,115).

Metformin utječe na međustaničnu komunikaciju mijenjajući izražaj koneksina. *In vitro* u srčanim stanicama hiperglikemija je dovela do smanjenja izražaja Cx43, dok je terapija metforminom uspjela povratiti izražaj Cx43 na normalnu razinu (124). Metformin je također ublažio smanjenje izražaja Cx43 u modelu atrijske fibrilacije (125).

1.6.3. Liraglutid

Liraglutid je dodatna terapija druge linije za liječenje oboljelih od DM2 te se primjenjuje u obliku supkutanih injekcija jednom dnevno (126). Agonist je GLP-1. Glukagonu sličan peptid-1 jest inkretinski hormon koji luče intestinalne L-stanice i alfa-stanice gušterače (127). Vrijeme poluživota vrlo mu je kratko ($t_{1/2}$ 1-2 min) zbog brze enzimatske razgradnje dipeptidil-peptidazom 4 (DPP-4) (71,128). Liraglutid je modificiran GLP-1 pa je, za razliku od njega, metabolički stabilniji te se čvršće veže za proteine plazme. To ga čini otpornijim na razgradnju DPP-4 pa mu je vrijeme poluživota u odnosu na GLP-1 produljeno ($t_{1/2}$ 11-13 h) (71,129,130). U *in vitro* uvjetima (tehnika ravnotežne dijalize) 99 % liraglutida vezano je za glavni protein plazme, albumin. Posljedično, volumen distribucije relativno mu je mali (11–24,7 L) te je uglavnom raspodijeljen intravaskularno i u izvanstaničnom prostoru (131). Nakon supkutane primjene polagano se apsorbira te mu vrijeme do maksimalne koncentracije u plazmi (t_{max}) iznosi otprilike 12 sati. Bioraspoloživost liraglutida iznosi otprilike 55 % (131,132). Brzina eliminacije smanjena je prvenstveno zbog usporenoga metabolizma i glomerularne filtracije (131).

Glukagonu sličan peptid-1 i njegovi agonisti ostvaruju svoje učinke vezujući se za GLP-1 receptore (GLP-1R). Osim u gušterači, GLP-1R nalazi se i u drugim organima kao što su bubrezi, srce i pluća (71). U bubrezima GLP-1R smješten je unutar kore, uglavnom u krvožilnom sustavu, dok su neka istraživanja opisala njihovu prisutnost i u proksimalnim kanalićima (133).

Liječenje liraglutidom započinje dozom od 0,6 mg dnevno koja se primjenjuje tjedan dana. Nakon toga dnevna doza povećava se s 1,2 mg do 1,8 mg. Nižom početnom dozom smanjuju se moguće gastrointestinalne nuspojave lijeka (131). Dnevna doza liraglutida u eksperimentalnim uvjetima za štakore manja je te iznosi od 0,1 do 0,4 mg/kg te se može primijeniti jedan ili dva puta dnevno (130).

U oboljelih od DM-a liraglutid regulira povišene vrijednosti glukoze tako što potiče, o glukozi ovisnu, sekreciju inzulina, inhibira sekreciju glukagona, smanjuje inzulinsku rezistenciju i apetit uz posljedični gubitak težine (83,129,133). Uz to, liraglutid usporava želučano pražnjenje djelujući na motilitet (127,130,132). Sekrecija inzulina ovisna o glukozi označava izlučivanje inzulina samo u slučajevima kad su vrijednosti glukoze povišene, tako da nema rizika od hipoglikemije. Ta se sekrecija odvija putem aktivacije cikličkoga adenozin monofosfata (cAMP). Aktivacija cAMP-a djeluje putem protein kinaze A (PKA) na povećanje unutarstanične koncentracije kalcija, što pak uzrokuje egzocitozu inzulina. Protein kinaza A važna je i za funkciju ER-a jer njezinom aktivacijom liraglutid ublažava ER-stres (83) što doprinosi smanjenju inzulinske rezistencije i ublažava endotelnu disfunkciju u oboljelih od DM-a (134). Time se znatno usporava progresija DN-a te se odgađa završni stadij KBB-a ($eGFR < 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) (135).

Osim što kontrolira glikemiju, liraglutid potiče gubitak težine u pretilih osoba (126), regulira povišene vrijednosti arterijskoga krvnoga tlaka te ima povoljan učinak na lipidni profil (136,137). Upravo se zbog takvoga blagotvornog djelovanja na pojedine sastavnice MS danas koristi u terapiji oboljelih od MS (83).

Od češćih nuspojava treba istaknuti gastrointestinalne smetnje kao što su mučnina, povraćanje i proljev koji su ovisni o dozi liraglutida te se obično pojavljuju u prvim tjednima liječenja (138).

Pojedina istraživanja pokazuju da bi učinkovitost terapije liraglutidom mogla ovisiti o spolu (129). Od 417 bolesnika s DM2, koji su liječeni liraglutidom, 54 % postiglo je kontrolu glikemije, s tim da su žene imale povećane izgled u odnosu na muškarce (126). Prema rezultatima retrospektivne studije, učinak liraglutida na smanjenje tjelesne težine bio je značajno veći kod žena nego kod muškaraca, i to pri svim ispitivanim dozama do 3 mg (129). Međutim, istraživanje na šesnaest muškaraca i jednako toliko žena dokazalo je da spol nema nikakav utjecaj na farmakokinetiku liraglutida, kada se u obzir uzme tjelesna težina (132).

Agonisti GLP-1 štite brojne organe od različitih oštećenja – u mozgu smanjuju mogućnost neuronske smrti nakon subarahnoidalnoga krvarenja, u srcu ublažavaju oštećenje miokarda nastalo nakon reperfuzijske ozljede, štite jetru od ishemijsko-reperfuzijske ozljede dok u plućima ublažavaju akutno oštećenje endotela (139). Kardiovaskularni čimbenici rizika, kao što su arterijska hipertenzija, pretilost i hiperlipidemija, znatno su umanjeni upotrebom

GLP-1 agonista. Oni također modificiraju upalni odgovor, smanjujući razinu pojedinih upalnih čimbenika te štite endotelne stanice od oštećenja (136,139).

Agonisti GLP-1 važni su lijekovi koji ublažavaju oštećenja bubrega povezana s DM-om i pretilosti kao jednom od glavnih sastavnica MS-a (139).

U oboljelih od DM-a terapija liraglutidom djeluje blagotvorno na različita patološka oštećenja glomerula (proširenje mezangija, zadebljanje GBM-a, oštećenje podocita, glomeruloskleroza), a uz to učinak liraglutida vidi se i u tubulointersticijskom području (128,133,140).

Mehanizmi kojima liraglutid ublažava stupanj tubulointersticijske fibroze uključuju supresiju TGF- β i njegovih signalnih puteva, uz smanjenje EMT stanica kanalića (133). Poznato je da TGF- β 1 ima ključnu ulogu u razvoju fibroze bubrega te je jedan od pokretača EMT-a. Na mišjem UUO modelu detaljno je objašnjen antifibrozni učinak liraglutida. Taj je model jedan od najviše korištenih modela za bubrežnu fibrozu koji dovodi do atrofije kanalića i nakupljanja ECM proteinskih depozita te uzrokuje intersticijsku fibrozu (71).

Na štakorskom modelu DM2 dokazano je da liraglutid ublažava proširenje mezangija, smanjuje zadebljanje GBM-a i fuziju nožica podocita, što se klinički očitovalo smanjenjem albuminurije i serumskoga kreatinina. Navedene su glomerularne promjene također bile povezane sa supresijom TGF- β 1, uz smanjen izražaj fibronektina i kolagena IV (128). Smanjenje albuminurije dokazano je i u oboljelih od DM2. U LEADER studiji (engl. *Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results*) razina albuminurije snižena je nakon primjene liraglutida u bolesnika čija je bubrežna funkcija još uvijek održana u normalnim granicama, ali i u onih s umjerenim smanjenjem eGFR-a (30 – 60 mL/min/1,73 m²) (55).

Kod HFD štakora s MS-om (poremećaj tolerancije glukoze, pretilost, hiperlipidemija), koji su liječeni liraglutidom, uočeno je smanjenje veličine glomerula te ublažavanje stupnja glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze, što je bilo povezano sa smanjenom razinom TGF- β 1 i IL-6 (140). Neki su od dodatnih mehanizama kojima liraglutid postiže blagotvorno djelovanje u bubrezima – smanjenje oksidativnoga stresa i poticanje natriureze (133).

Nedavno je opisan utjecaj liraglutida na međustaničnu komunikaciju (141,142). Dva su istraživanja opisala njegov učinak na izražaj koneksina, i to u srcu. Kod pretilih miševa, hranjenih HFD-om, liraglutid je obnovio smanjeni izražaj kardijalnoga Cx43 (142). Nadalje, u štakora s DM2 također je uspio normalizirati smanjeni izražaj Cx43 (141).

2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1. Šećerna bolest tipa 1 i suplementacija s različitim omjerom između n-6 i n-3 PUFA-a moduliraju izražaj koneksina i paneksina u bubrezima dijabetičnih štakora.
2. Prehrana s visokim udjelom masti i šećera te terapija metforminom ili liraglutidom moduliraju izražaj koneksina i paneksina u bubrezima pretilih štakora.
3. Dugotrajna prehrana s visokim udjelom masti i šećera dovodi do patohistoloških promjena u bubrezima pretilih štakora.
4. Učinci metformina i liraglutida u bubrezima ovise o spolu.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je odrediti lokalizaciju i distribuciju Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima štakora. Koristeći model DM1 induciranoga STZ-a, istražen je utjecaj DM-a na bubrežnu imunoekspresiju navedenih koneksina i paneksina. S obzirom na rastući broj studija o pozitivnom učinku PUFA bogate prehrane, istražen je utjecaj suplementacije s različitim omjerima između omega-6 i omega-3 masnih kiselina na izražaj Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima dijabetičnih štakora.

Također, cilj je bio istražiti i utjecaj dugotrajne prehrane s visokim udjelom masti i šećera na imunoekspresiju Cx45 i Panx1, kao i učinak lijekova metformina i liraglutida na bubrežni izražaj Cx45 i Panx1 u štakora hranjenih HFHSD-om. Istražen je utjecaj dugotrajne prehrane u čijem je sastavu visok udio masti i šećera na promjene u histološkoj građi bubrega te je istraženo postoji li povezanost između patoloških promjena u tkivu bubrega i izražaja navedenih čimbenika.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Pokusne životinje za model šećerne bolesti tipa 1

Prvi dio istraživanja dio je znanstveno-istraživačkog projekta „Nutritivna modulacija metabolizma dokozaheksaenske kiseline kod dijabetičke dislipidemije” (HRZZ-IP-2014-09-8992) uz suglasnost Ministarstva poljoprivrede i šumarstva RH i Nacionalnog bioetičkog povjerenstva RH (Klasa 01-13/15-08/8, Ur. br.: 100-01/15-2). Animalni eksperimenti provedeni su u Institutu za medicinska istraživanja u Zagrebu.

U prvom dijelu istraživanja korišteno je 25 Wistar štakora muškoga spola u starosti 10 do 12 tjedana, težine 350 do 410 g iz Jedinice za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja u Zagrebu. Laboratorijski uvjeti bili su kontrolirani – temperatura je održavana na 22° C uz 12-satnu izmjenu svjetlosti i tame dok je pristup hrani i vodi bio slobodan.

Standardna laboratorijska hrana za štakore sadržavala je 20 % sirovih proteina, 5 % sirove masti i 5 % sirovih vlakana. Takav sastav hrane izmijenjen je različitim mješavinama suncokretovoga, lanenoga i ribljega ulja, kako bi se dobili različiti n-6/n-3 omjeri (1, 7 i 60) (143,144).

Štakori su nasumično podijeljeni u četiri skupine, ovisno o vrsti hrane koju su dobivali: C – kontrolna skupina štakora (n = 7) na prehrani s n-6/n-3 omjerom ≈ 7 (dodatak 2 % suncokretovoga i 0,5 % lanenoga ulja); STZ – dijabetična skupina štakora (n = 6) na prehrani s n-6/n-3 omjerom ≈ 7 (dodatak 2 % suncokretovoga i 0,5 % lanenoga ulja); STZ + N6 – dijabetična skupina štakora (n = 6) na prehrani s n-6/n-3 omjerom ≈ 60 (dodatak 2,5 % suncokretovog ulja); STZ + N3 – dijabetična skupina štakora (n = 6) na prehrani s n-6/n-3 omjerom ≈ 1 (dodatak 2,5 % ribljega ulja sa 16 % EPA i 19 % DHA).

Nakon prilagodbe u trajanju od dva tjedna i noćnoga gladovanja, DM je induciran kod štakora iz skupine STZ, STZ + N6 i STZ + N3 intraperitonealnom aplikacijom STZ u dozi od 55 mg/kg. Streptozotocin je bio otopljen u puferu natrijevoga citrata (pH 4,5). Štakorima iz kontrolne skupine intraperitonealno je aplicirana otopina čistoga citratnog pufera. Kako bi se smanjila štetnost davanja STZ-a, prva dva dana nakon njegovoga apliciranja, štakori su dobivali 10 % otopine saharoze.

Vrijednosti glukoze u plazmi izmjerene su glukometrom Accu-Check Go. Svi štakori čija je

vrijednost glukoze u plazmi bila iznad 16,5 mmol/L smatrali su se dijabetičnim.

Štakori su anestetizirani intraperitonealnom injekcijom Narketan/Xylapan (Narketan 80 mg/kg, Xylapan 12mg/kg; Vétoquinol, Bern, Švicarska) 30 dana nakon primjene STZ/citratnoga pufera, te su usmrćeni iskrvarenjem. Odmah nakon žrtvovanja, štakorima su odstranjeni bubrezi, koji su potom fiksirani u 4 % puferiranom formalinu.

4.2. Pokusne životinje za model metaboličkoga sindroma

Drugi dio istraživanja dio je suradnje i istraživanja *Cedars-Sinai Medical Center's International Research and Innovation in Medicine Program, the Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology (RECOOP HST Association)*, uz sudjelovanje *Cedars-Sinai Medical Center – RECOOP Research Centers (CRRCs)*. Animalni eksperimenti provedeni su na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Szegedu, uz odobrenje mjerodavnoga Etičkog povjerenstva (IV/3796/2015) i uz suradnju Medicinskoga fakulteta u Osijeku i *Semmelweis University, Budapest*.

U istraživanju je korišteno 48 Sprague-Dawley štakora oba spola iz Nastambe za životinje Sveučilišta u Segedu, Mađarska. Starost štakora bila je 44 tjedna. Štakori su bili smješteni u polipropilenskim kavezima u kojima je površina poda bila 1800 cm³. U svakom su kavezu bila smještena četiri štakora, a uvjeti u kojima su boravili održavani su u određenom rasponu (temperatura 20 – 23°C, vlažnost 40 – 60 %). Izmjena svjetlosti i tame odvijala se u 12-satnim intervalima.

Štakori su nasumično raspoređeni u osam skupina, i to po četiri od svakoga spola: Ctrl – kontrolna skupina štakora (ženke: n = 5, mužjaci: n = 6); HFHSD – skupina neliječenih štakora na prehrani s visokim udjelom masti i šećera (ženke: n = 5, mužjaci: n = 5); HFHSD + Metf. - skupina štakora liječenih metforminom na prehrani s visokim udjelom masti i šećera (ženke: n = 6, mužjaci: n = 8); HFHSD + Lir. – skupina štakora liječenih liraglutidom na prehrani s visokim udjelom masti i šećera (ženke: n = 5, mužjaci: n = 8).

Kontrolna skupina štakora hranjena je *ad libitum* standardnom hranom (1324, *Standard diet, Altromin Spezialfutter GmbH & Co Lage*, Njemačka) koja je sadržavala 65 % ugljikohidrata (5 % disaharida, 39 % polisaharida), 11 % masti i 24 % proteina. Preostale tri skupine štakora hranjene su hranom s visokim udjelom masti i šećera (C1011, *Carbohydrate & fat-rich diet*,

Altromin Spezialfutter GmbH & Co Lage, Njemačka) u kojoj je bilo 56 % ugljikohidrata (18 % disaharida, 36 % polisaharida), 28 % masti i 16 % proteina.

Liječenje štakora započelo je šest tjedana nakon početka HFHSD-a. Štakori iz skupine HFHSD + Metf. dobivali su 50 mg/kg metformina na dan, dok su štakori iz HFHSD + Lir. skupine dobivali dnevnu dozu od 0,3 mg/kg liraglutida. Doza metformina određena je prema istraživanju Narasimhana i suradnika koji su primjenjivali dozu od 50 mg/kg za liječenje štakora metforminom u trajanju od 30 dana (117). Oba su lijeka bila otopljena u posebnom puferu (0,5 mg dinatrij hidrogen fosfat dihidrata, 4,7 mg propilen glikola i 1,8 mg fenola u 1 mL vodene otopine uz pH 8,5). Kontrolna skupina dobivala je svakodnevno 0,1 mL pufera. Metformin i liraglutid primjenjivani su supkutano tijekom četrnaest tjedana.

Intraperitonealni test tolerancije na glukozu napravljen je u 18. tjednu od početka liječenja. Svakom je štakoru intraperitonealno aplicirana otopina 25 % glukoze u dozi od 2 mg/kg. Razina glukoze u krvi određena je prije i dva sata nakon injekcije glukoze. Uzorci krvi dobiveni su iz repne vene te je razina glukoze određena pomoću glukometra (OneTouch UltraMini, Milpitas, SAD).

Triacilgliceroli su određivani iz uzoraka seruma dobivenih natašte, standardnim kliničkim laboratorijskim metodama u Središnjem kliničkom laboratoriju Sveučilišta Semmelweis.

Štakori su žrtvovani u 19. tjednu u dubokoj anesteziji izofluranom (Forane; Baxter Healthcare Corp. Deerfield, SAD). Potom je učinjena srčana punkcija kojom se prikupio sadržaj cjelokupne krvi te su pripremljeni uzorci seruma koji su pohranjeni na -20°C za daljnja mjerenja. Nakon što su odstranjeni bubrezi, uklonjena im je okolna mast te su odmah izvagani analitičkom vagom (ENTRIS64-1S, Sartorius AG, Goettingen, Njemačka). Bubrezi su zatim fiksirani u puferiranom 4 % paraformaldehidu.

4.3. Obrada bubrega za daljnju analizu

Nastavak istraživanja na prikupljenim tkivima proveden je u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Uzorci bubrega ispirani su u fosfatnom puferu (engl. *Phosphate buffered saline*, PBS; pH 7,2) na temperaturi od 4° C tijekom 24 sata. U tom razdoblju izvršeno je deset izmjena PBS-a. Nakon ispiranja bubrezi su podvrgnuti procesu dehidracije. Prilikom svake inkubacije s otopinama rastućega postotka etanola učinjene su tri izmjene alkohola. Najprije su inkubirani u otopinama s 25 % etanola u vremenu od 90 minuta. Nakon toga bubrezi su inkubirani u otopinama s 50 % etanola, također tijekom 90 minuta. Zatim su preko noći na temperaturi od 4° C uzorci inkubirani u otopini sa 70 % etanola. Sljedećeg je dana uslijedila inkubacija bubrega u otopini s 96 % etanola u trajanju od 120 minuta. Konačna dehidracija u otopini sa 100 % etanola izvršena je tijekom noći na temperaturi od 4° C. Dan nakon učinjena je inkubacija uzoraka bubrega u ksilolu, tri puta po 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon toga su uzorci uronjeni u tekući parafin na temperaturi od 60° C i u trajanju od 120 minuta tijekom kojih su učinjene tri izmjene parafina. Potom su uklopljeni u kalupe te je uslijedilo brzo hlađenje tako dobivenih parafinskih blokova. Pomoću mikrotoma parafinski blokovi su rezani na rezove debljine 5 µm. Tako dobiveni rezovi poravnavali su se korištenjem vodene kupelji koja je bila zagrijana na temperaturu od 45° C, nakon čega su postavljeni na predmetna stakalca.

4.4. Priprema tkiva za imunohistokemiju, imunofluorescenciju te histološke metode

Poslije deparafinizacije u ksilenu i rehidracije u otopinama etanola padajućih koncentracija, rezovi su zagrijani na 95° C, 12 minuta u citratnom puferu (pH 6,0) te su potom isprani PBS-om. Kad su se ohladili na sobnu temperaturu, inkubirani su s primarnim protutijelima (Tablica 2.). Inkubacija primarnim protutijelima provedena je tijekom noći na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Za detekciju primarnih protutijela korištena su odgovarajuća sekundarna protutijela (Tablica 2.), s kojima je inkubacija trajala tijekom jednoga sata na sobnoj temperaturi. Potom su rezovi ispirani PBS-om, osušeni na zraku i pokriveni stakalcima, uz korištenje medija za uklapanje (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, USA).

U istraživanju na štakorskom modelu DM1 primijenjeno je i dvostruko bojanje lektinima (Tablica 2.). Nakon inkubacije i ispiranja primarnih protutijela na rezovima je primijenjen jedan od fluoresceinom konjugiranih lektina (*Dolichos Biflorus Agglutinin* – DBA ili *Lotus Tetragonolobus Lectin* – LTL). Lektini su inkubirani dva sata na sobnoj temperaturi te su potom isprani u PBS-u. Za prikaz jezgri korišteno je DAPI (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) bojanje. U kontrolnom bojanju izostavljena su primarna protutijela, što je rezultiralo odsutnošću bojanja u tkivu.

Tablica 2. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela i lektina.

	protutijela	kataloški broj	domaćin	razrjeđenje	proizvođač
primarna protutijela	Anti-Cx40/GJA5	ab213688	kunić	1 : 100	Abcam plc. 330 Cambridge, CB4 OFL, UK
	Anti-Connexin 45/GJA7/Cx45	sc-135474	kunić	1 : 100	
	Anti-Connexin 43 / GJA1	ab87645	koza	1 : 300	
	Anti-Pannexin-1/PANX1	ABN242	kunić	1 : 300	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
sekundarna protutijela	AlexaFluor®488 Affini Pure Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L)	711-545-152	magarac	1 : 400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA
	Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H + L)	705-295-003			
	Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L)	711-295-152			
lektini	Fluorescein labeled Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA)	FL-1031	-	1 : 400	Vector Laboratories Ltd. Peterborough, United Kingdom
	Fluorescein labelled Lotus Tetragonolobus Lectin (LTL)	FL-1321	-	1:400	

U istraživanju na štakorima hranjenim HFHSD-om primijenjene su i standardne histološke metode bojanja tkiva. Nakon deparafinizacije rezovi su obojeni fosfovolframskom kiselinom i hematoksilinom (PTAH), perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (PAS) ili trikromnim bojanjem po Malloryju.

4.5. Analiza slika i kvantifikacija

Svi su rezovi bubrega pregledani korištenjem mikroskopa (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani pomoću hladene digitalne kamere (DP71, Olympus, Tokyo, Japan). Snimljene su nepreklapajuće fotografije čitave kore bubrega pri povećanju objektiva od $40 \times$ i $10 \times$ (konačno povećanje $400 \times$ i $100 \times$) uz stalnu vremensku ekspoziciju. Budući da su rezovi bili označeni šiframa (kombinacija slova i brojeva), ispitivač koji je provodio snimanje nije znao kojoj skupini rezovi pripadaju.

Svim je fotografijama jednoga reza bubrega dodijeljen broj od 1 i nadalje, ovisno o njihovom broju. Odabir fotografija izvršen je pomoću programa Research Randomizer.

4.5.1. Imunohistokemijska analiza

U istraživanju na štakorskom modelu DM1 nasumično je odabrano deset fotografija po rezu bubrega za daljnju analizu.

Za istraživanje na štakorima na dugotrajnoj HFHSD nasumično je izabrano deset fotografija po rezu za analizu izražaja Panx1, odnosno njih sedam do osam za analizu izražaja Cx45.

Imunofluorescencija u obliku sitnih zrnaca interpretirana je kao pozitivni izražaj koneksina i paneksina (zeleno zrnca Cx40, Cx43 i Panx1; crvena zrnca Cx45).

Računalni program ImageJ (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) korišten je za kvantitativnu analizu slika. Prije samoga postupka analize, mikrofotografije su obrađene korištenjem medijan filtera uz širinu od dva piksela. Rezultirajuće fotografije konvertirane su u 8-bitne te je primijenjen algoritam „Triangle” za određivanje graničnoga praga imunofluorescencije. To je napravljeno kako bi se što više izolirao signal fluorescentne boje od autofluorescencije bubreznoga tkiva te kako bi se preciznije izvršila analiza. Analizom je

zatim izmjeren postotak površine zahvaćen imunofluorescencijom za sva bojanja osim za Panx1 u štakora hranjenih HFHSD-om, gdje je analiza napravljena brojenjem zrnaca u glomerulima i tubulima.

4.5.2. Patohistološka analiza

Za istraživanje na štakorima na dugotrajnoj HFHSD-i izabrano je dvadeset fotografija (povećanje objektiva 40 ×) obojenih PAS-bojanjem. Dodatni uvjet za odabir fotografije bio je da je na njoj prikazan barem jedan glomerul.

Zatim je na tim glomerulima analizirana debljina BC-a te je određen stupanj glomerularnoga oštećenja. Debljina BC-a izmjerena je u području najmanje šest različitih točaka koje su nasumično odabrane pomoću mrežnoga alata sa slučajnim pomakom u računalnom programu Image-J. Točno mjesto mjerenja bilo je sjecište okomitih i vodoravnih linija mrežnoga alata s vanjskom membranom BC-a.

Glomerularno oštećenje ocijenjeno je kao:

- 0 – bez skleroze
- 1 – minimalna skleroza (< 25 %)
- 2 – blaga skleroza (25 – 50 %)
- 3 – umjerena skleroza (50 – 75 %)
- 4 – teška skleroza (> 75 %) (145).

Za svakoga štakora glomerularni je zbroj određen formulom:

$$(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4.$$

Element n_x predstavlja broj glomerula koji su jednako ocijenjeni (146,147).

Stupanj tubulointersticijske fibroze analiziran je na svim fotografijama presjeka kore bubrega (povećanje objektiva 10 ×) obojenih trikromnim bojanjem po Malloryju.

Tubulointersticijska fibroza ocijenjena je kao:

- 0 – bez fibroze
- 1 – manje od 10 %
- 2 – 10 – 25 %
- 3 – 25 – 75 %
- 4 – više od 75 % fibroznih lezija (145,146).

Mitohondriji su analizirani na 17 do 21 odabranih fotografija po rezu bubrega obojenom PTAH-om. Fotografije su snimljene pri povećanju objektiva od $40\times$. Analizom je kvantificiran postotak površine svakoga reza obuhvaćenoga mitohondrijima, korištenjem računalnoga programa ImageJ.

4.6. Statističke analize

Za statističke analize korišten je računalni program PAST 3.22 (148). Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija ($AS \pm SD$). Normalnost raspodjele podataka procijenjena je Shapiro-Wilkovim testom.

U istraživanju na štakorskom modelu DM1 broj jedinki po skupini (N) bio je od 5 do 7. ANOVA s Welchovom korekcijom za nejednake varijance korištena je za utvrđivanje značajnih razlika među skupinama. Razlike među pojedinim skupinama ispitane su T-testom s Welchovom korekcijom za nejednake varijance. Podatci za izražaj Cx43 i Panx1 transformirani su logaritamski prije analize zbog odstupanja od normalne raspodjele.

Za izračunavanje veličine uzorka u istraživanju na štakorima hranjenim HFHSD-om korištena je Meadova jednadžba resursa (149,150) za jednosmjernu usporedbu skupina (između jedinki). Izračunata minimalna potrebna veličina pokusne skupine bila je $n = 4$. Kako bi se usporedili podatci između pokusnih skupina, korišten je Kruskal-Wallisov test, a zatim Mann-Whitneyev test za usporedbu između pojedinih skupina.

Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Lokalizacija Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima dijabetičnih štakora

Najveći izražaj svih četiriju ispitivanih proteina uočen je u proksimalnim kanalićima, što je potvrđeno dodatnim bojanjem LTL biljgom proksimalnih kanalića, i to u rezovima bubrega kontrolne skupine štakora.

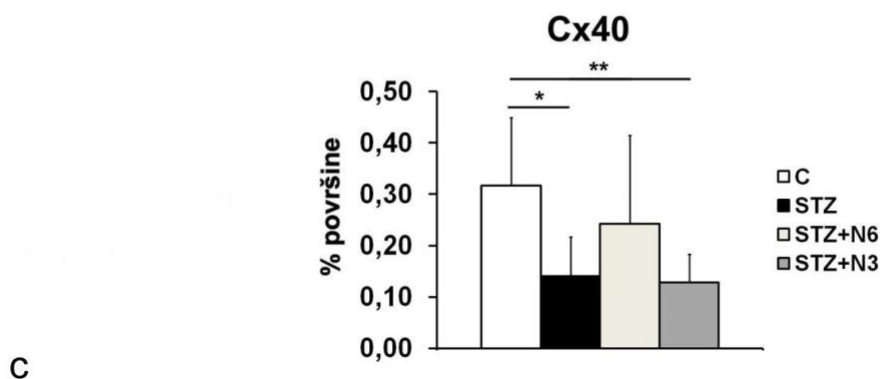
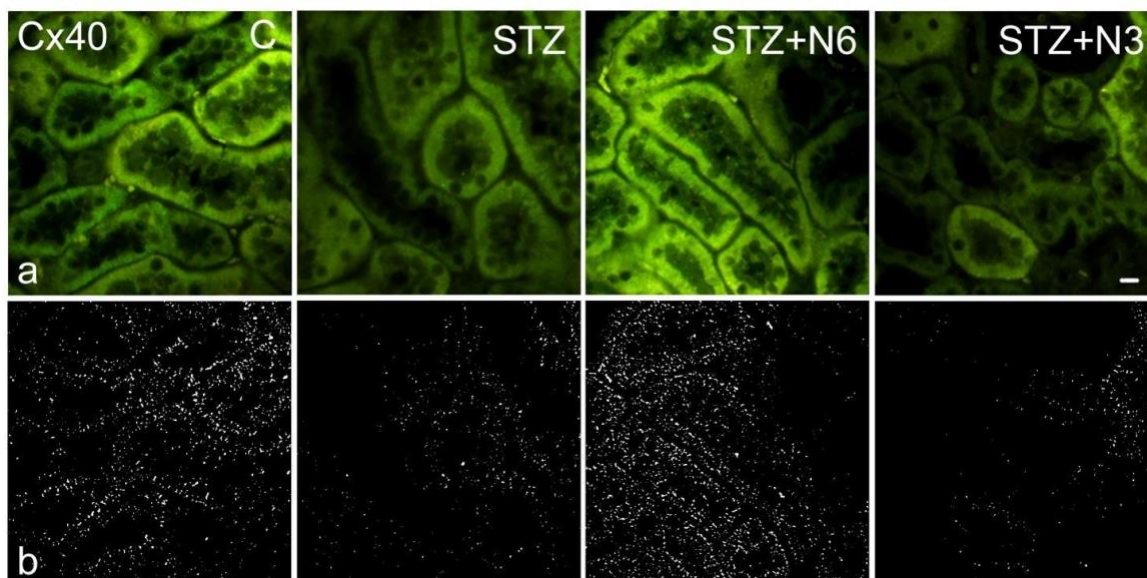
5.2. Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 i prehrane bogate polinezasićenim masnim kiselinama na izražaj Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima štakora

Eksperimentalni DM1 doveo je do značajnoga smanjenja izražaja Cx40 u bubrezima dijabetičnih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom (C, $P < 0,05$; Slika 5.). Dodatak DHA-e i EPA-e u prehrani (STZ + N3) nije doveo do promjene izražaja Cx40 u bubrezima dijabetičnih štakora u usporedbi sa STZ skupinom. U skupini STZ + N3 izražaj Cx40 bio je značajno manji u odnosu na skupinu C ($P < 0,01$). Nadalje, promjena izražaja Cx40 u štakora na prehrani s visokim omjerom n-6/n-3 (STZ + N6) nije bila značajna u odnosu na kontrolu.

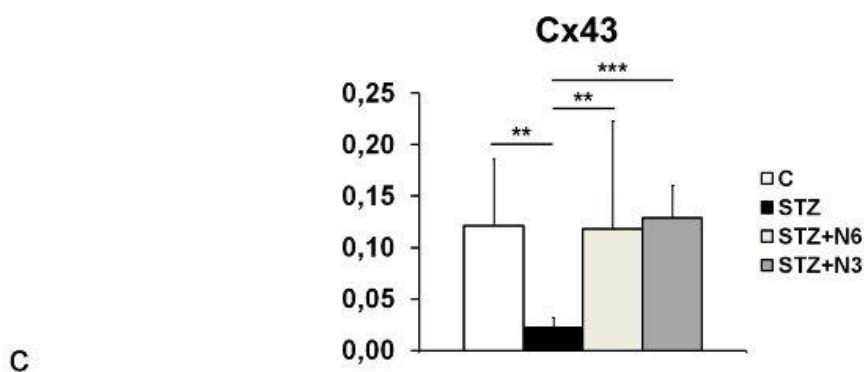
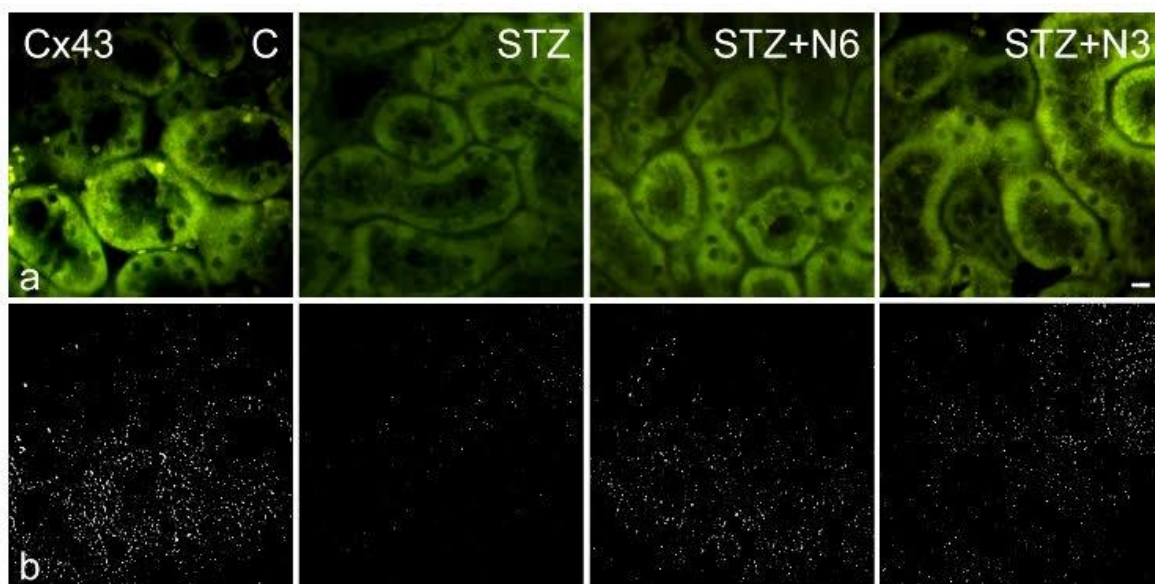
Utvrđeno je značajno smanjenje izražaja Cx43 u bubrezima dijabetičnih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,01$; Slika 6.). Prehrana obogaćena PUFA-ama, uz visokiomjer n-6/n-3 (STZ + N6) te dodatak DHA-e i EPA-e (STZ + N3) uzrokovala je povećanje izražaja Cx43 na razinu izražaja u kontrolnoj skupini ($P < 0,01$ i $P < 0,001$, u usporedbi sa STZ skupinom).

Utjecaj DM1 na izražaj Cx45 u bubrezima štakora nije bio značajan (Slika 7.). Međutim, DM1 uz prehranu s visokim omjerom n-6/n-3 (STZ + N6) rezultirao je značajnim smanjenjem izražaja Cx45 u usporedbi s C i STZ skupinom ($P < 0,01$ i $P < 0,05$).

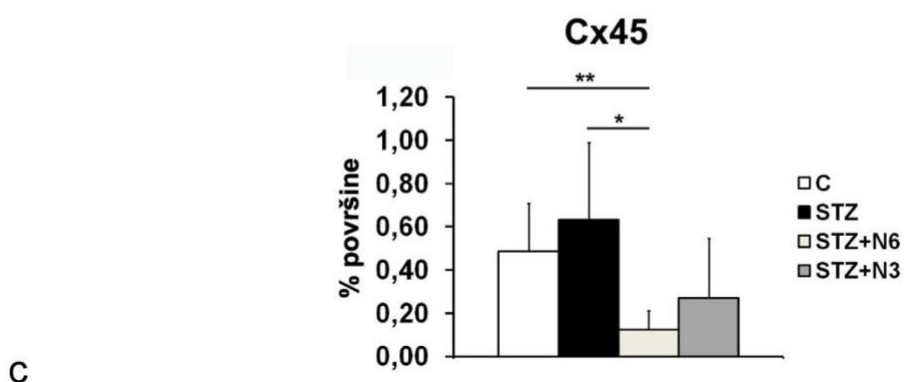
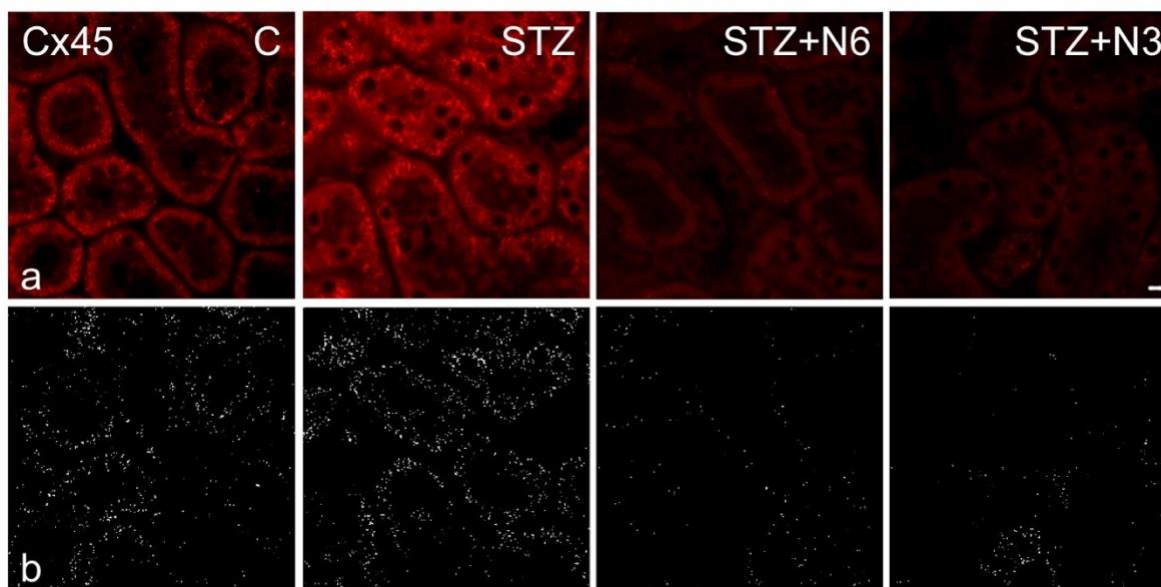
Uočeno je značajno povećanje izražaja Panx1 u bubrezima dijabetičnih štakora (STZ) u odnosu na kontrolnu skupinu (C; $P < 0,05$; Slika 8.). Prehrana s visokim omjerom n-6/n-3 (STZ + N6) smanjila je izražaj Panx1 na razinu izražaja u C skupini ($P < 0,01$ u usporedbi sa STZ-om). Ipak, dodatak DHA-e i EPA-e (STZ + N3) nije imao takav učinak.



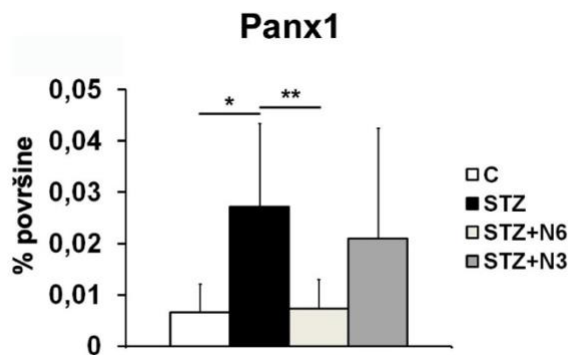
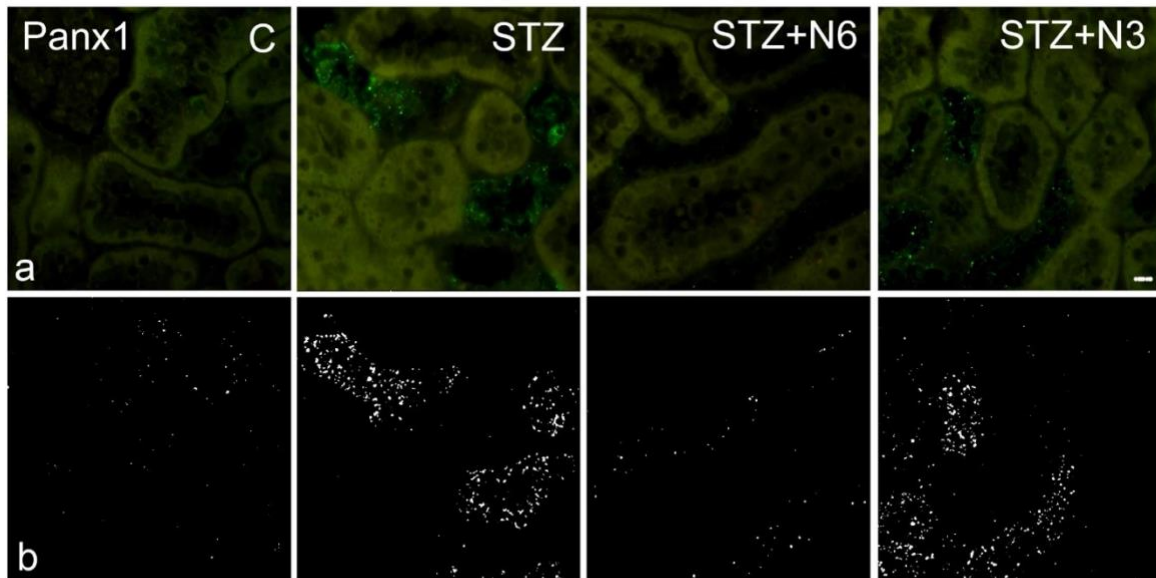
Slika 5. Izražaj koneksina 40 (Cx40) u bubrezima pokusnih štakora. Reprezentativne mikrofotografije pokazuju imunoekspresiju Cx40 u bubrežnoj kori pokusnih štakora. C – kontrolna skupina, STZ – dijabetična skupina, STZ + N6 – dijabetična skupina hranjena n-6/n-3 omjerom od 60 i STZ + N3 – dijabetična skupina hranjena n-6/n-3 omjerom od 1 (16 % EPA-e i 19 % DHA-e); red a – originalne fotografije; red b – fotografije s pragom. Graf – postotak granične površine (postotak površine) Cx40 mjereno je na mikrofotografijama bubrežne kore u četirima eksperimentalnim skupinama životinja. Mjerilo = 20 μ m (odnosi se na sve). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ između navedenih skupina.



Slika 6. Izražaj koneksina 43 (Cx43) u bubrezima pokusnih štakora. Reprezentativne mikrofotografije pokazuju imunoekspresiju Cx43 u bubrežnoj kori pokusnih štakora. C – kontrolna skupina, STZ – dijabetična skupina, STZ + N6 – dijabetična skupina hranjena n–6/n–3 omjerom od 60 i STZ + N3 – dijabetična skupina hranjena n–6/n–3 omjerom od 1 (16 % EPA-e i 19 % DHA-e); red a – originalne fotografije; red b – fotografije s pragom. Graf – postotak granične površine (postotak površine) Cx43 mjereno je na mikrofotografijama bubrežne kore u četirima eksperimentalnim skupinama životinja. Mjerilo = 20 μ m (odnosi se na sve). ** P < 0,01, *** P < 0,001 između navedenih skupina.



Slika 7. Izražaj koneksina 45 (Cx45) u bubrezima pokusnih štakora. Reprezentativne mikrofotografije pokazuju imunoekspresiju Cx45 u bubrežnoj kori pokusnih štakora. C – kontrolna skupina, STZ – dijabetična skupina, STZ + N6 – dijabetična skupina hranjena n–6/n–3 omjerom od 60 i STZ + N3 – dijabetična skupina hranjena n–6/n–3 omjerom od 1 (16 % EPA-e i 19 % DHA-e); red a – originalne fotografije; red b – fotografije s pragom. Graf – postotak granične površine (postotak površine) Cx45 mjereno je na mikrofotografijama bubrežne kore u četirima eksperimentalnim skupinama životinja. Mjerilo = 20 μ m (odnosi se na sve). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ između navedenih skupina.



c

Slika 8. Izražaj paneksina 1 (Panx1) u bubrezima pokusnih štakora. Reprezentativne mikrofotografije pokazuju imunoekspresiju Panx1 u bubrežnoj kori pokusnih štakora. C – kontrolna skupina, STZ – dijabetična skupina, STZ + N6 – dijabetična skupina hranjena n–6/n–3 omjerom od 60 i STZ + N3 – dijabetična skupina hranjena n–6/n–3 omjerom od 1 (16 % EPA-e i 19 % DHA-e); red a – originalne fotografije; red b – fotografije s pragom. Graf – postotak granične površine (postotak površine) Panx1 mjereno je na mikrofotografijama bubrežne kore u četirima eksperimentalnim skupinama životinja. Mjerilo = 20 μ m (odnosi se na sve). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ između navedenih skupina.

5.3. Biokemijski parametri i mase bubrega štakora na dugotrajnoj prehrani s visokim udjelom masti i šećera

Biokemijski parametri i mase bubrega štakora prikazani su u Tablici 3.

U ženki iz skupine HFHSD + Lir. uočena je nešto veća ukupna masa bubrega (apsolutno i relativno prema tjelesnoj masi). Međutim, navedene razlike nisu bile značajne (u usporedbi s C, Kruskal-Wallis test $P = 0,0874$). Suprotno tome, primijećena je značajno niža ukupna masa bubrega u mužjaka iz skupine HFHSD + Lir. ($P = 0,0239$ u usporedbi s Ctrl. i $P = 0,0181$ u usporedbi s HFHSD-om), s time da nije bilo značajne razlike u bubrežnoj masi mužjaka štakora izraženo kao postotak tjelesne mase.

Uočen je poremećaj u kontroli glukoze u krvi svih ženki štakora (uključujući skupinu Ctrl.). Ženke štakora nisu mogle postići normalnu razinu glukoze u krvi dva sata nakon intraperitonealnoga apliciranja 2 mg/kg glukoze. Ženke štakora u Ctrl. skupini imale su $342,33 \pm 147,35$ % početne vrijednosti glukoze dva sata nakon injiciranja glukoze, dok su ženke štakora u neliječenoj HFHSD skupini imale $622,03 \pm 232,68$ % početne razine glukoze. Te su vrijednosti bile nešto niže u skupinama HFHSD + Metf. i HFHSD + Lir. Međutim, ove razlike nisu se značajno razlikovale. Suprotno ženkama, mužjaci štakora u Ctrl. skupini postigli su normalnu razinu glukoze u krvi dva sata nakon intraperitonealne injekcije glukoze ($146,37 \pm 5,30$ % početne vrijednosti glukoze u krvi). Prehrana s visokim udjelom masti i šećera u mužjaka rezultirala je povišenom vrijednošću glukoze u krvi dva sata nakon aplikacije glukoze ($P = 0,0518$ u odnosu na Ctrl.). Navedene se vrijednosti glukoze nisu uspjele regulirati terapijom metforminom ili liraglutidom (Ctrl. prema HFHSD + Metf. $P = 0,0142$; Ctrl. prema HFHSD + Lir. $P = 0,0085$).

Nadalje, primijećen je porast serumskih TAG-ova u ženki štakora iz skupina HFHSD i HFHSD + Metf., iako te razlike nisu postigle značajnu vrijednost. Međutim, u ženki štakora iz skupine HFHSD + Lir. uočene su značajno niže vrijednosti serumskih TAG-ova u usporedbi sa skupinama HFHSD ($P = 0,0481$) i HFHSD + Metf. ($P = 0,0348$). U skladu s tim, u mužjaka iz skupina HFHSD i HFHSD + Metf. vrijednosti TAG-a u serumu bile su značajno veće u usporedbi s Ctrl. skupinom ($P = 0,0439$ i $P = 0,0053$), dok TAG-ovi u serumu štakora iz skupine HFHSD + Lir nisu bili povećani.

Tablica 3. Biokemijski parametri i mase bubrega.

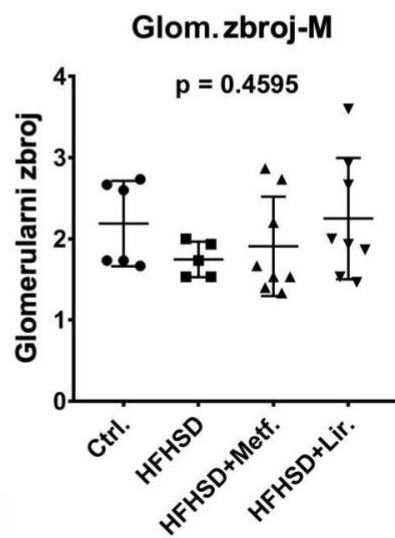
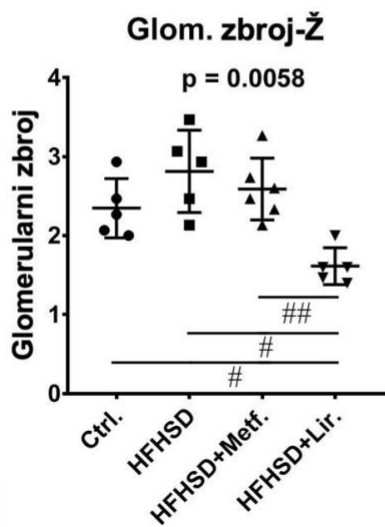
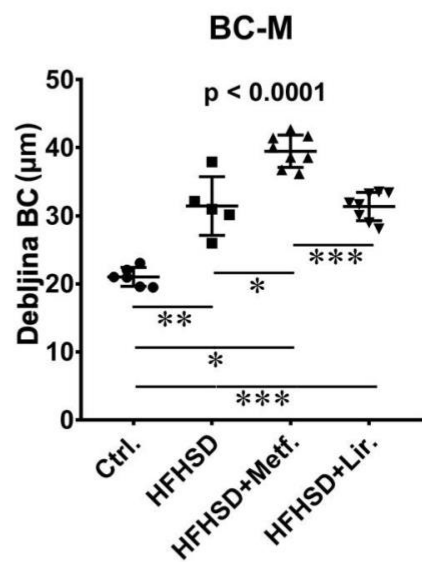
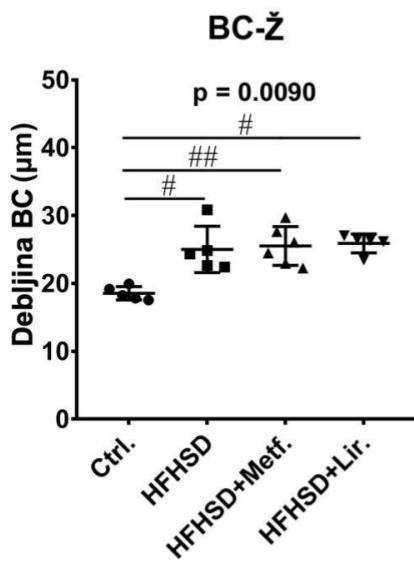
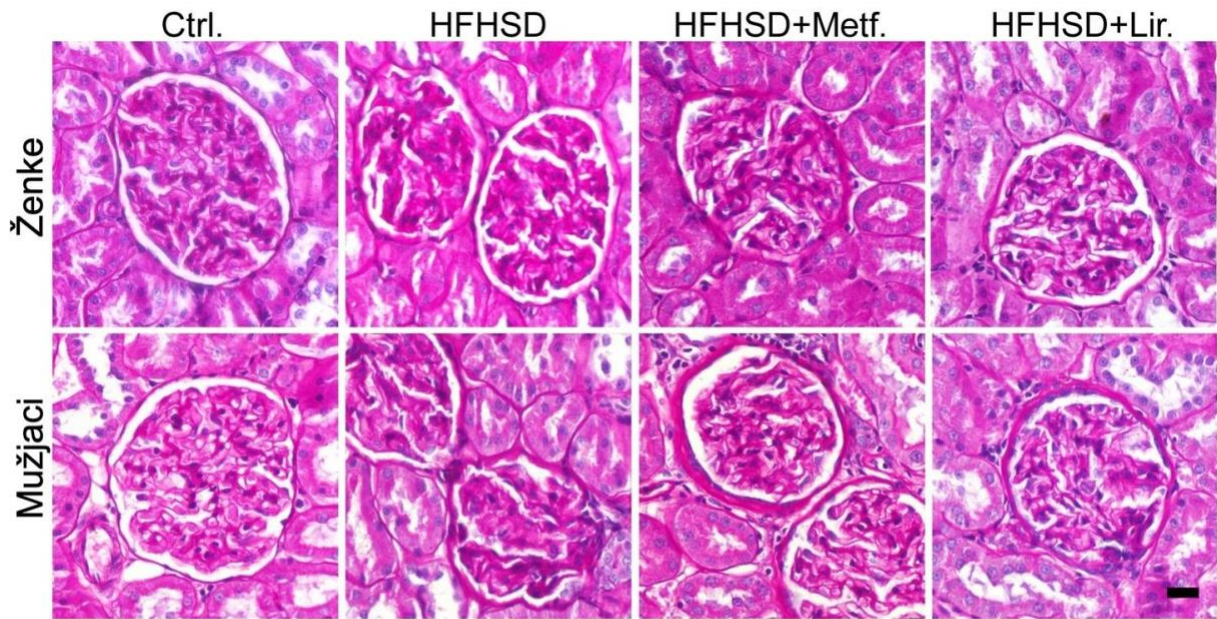
		PARAMETAR SREDNJA VRIJEDNOST ± SD (JEDINICA)				
		ukupna masa bubrega (g)	ukupna masa bubrega (% tjelesne mase)	2h IPGTT (mg/dl)	2h IPGTT (% početne razine)	triacilgliceroli (mm)
ženke	Ctrl.	2,04 ± 0,20	0,55 ± 0,03	242,75 ± 128,24	342,33 ± 147,35	0,90 ± 0,25
	HFHSD	2,33 ± 0,65	0,52 ± 0,08	419,80 ± 134,93	622,03 ± 232,68	1,48 ± 0,75
	HFHSD+Metf.	2,33 ± 0,28	0,56 ± 0,05	291,67 ± 103,84	408,79 ± 153,02	1,21 ± 0,48
	HFHSD+Lir.	2,42 ± 0,19	0,69 ± 0,10	366,20 ± 133,64	479,50 ± 226,60	0,68 ± 0,33 [#]
<i>ženke</i> – <i>P</i>		<i>0,1434</i>	<i>0,0874</i>	<i>0,2809</i>	<i>0,1364</i>	<i>0,0454</i>
mušjaci	Ctrl.	3,96 ± 0,39	0,66 ± 0,07	98,00 ± 3,56	146,37 ± 5,30	0,52 ± 0,08
	HFHSD	3,62 ± 0,22	0,55 ± 0,07	195,00 ± 97,86 [*]	247,43 ± 106,23 [*]	0,91 ± 0,24 [*]
	HFHSD+Metf.	3,82 ± 0,37	0,58 ± 0,07	192,83 ± 59,90 [*]	289,90 ± 88,57 [*]	1,00 ± 0,34 [*]
	HFHSD+Lir.	3,49 ± 0,57 ^{*\$}	0,58 ± 0,07	223,25 ± 107,66 [*]	276,58 ± 106,94 [*]	0,73 ± 0,26
<i>mušjaci</i> – <i>P</i>		<i>0,0335</i>	<i>0,1336</i>	<i>0,0209</i>	<i>0,0171</i>	<i>0,0059</i>

Kruskal-Wallisov test nakon kojeg slijedi Man-Whitney test. $P \leq 0,05$ u usporedbi s: * Ctrl.; # HFHSD; \$ HFHSD + Metf.

5.4. Utjecaj metformina i liraglutida na debljinu Bowmanove čahure u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera

Prehrana s visokim udjelom masti i šećera značajno je povećala debljinu BC-a u štakora oba spola, bez obzira na primijenjenu terapiju, i to u ženki (Ctrl. u odnosu na HFHSD, $P = 0,0122$; Ctrl. u odnosu na HFHSD + Metf., $P = 0,0081$ i Ctrl. u odnosu na HFHSD + Lir., $P = 0,0122$) te u mušjaka štakora (Ctrl. u odnosu na HFHSD, $P = 0,0081$; Ctrl. u odnosu na HFHSD + Metf., $P = 0,0024$ i Ctrl. u odnosu na HFHSD + Lir., $P = 0,0024$; Slika 9.).

Metformin i liraglutid nisu imali značajan utjecaj na debljinu BC-a kod ženki štakora hranjenih HFHSD. Međutim, kod mušjaka štakori hranjeni HFHSD-om te liječeni metforminom imali su najdeblji BC. U toj je skupini debljina BC-a bila značajno veća u usporedbi sa svim ostalim HFHSD skupinama muškoga spola ($P = 0,0104$ u odnosu na HFHSD i $P = 0,0009$ u odnosu na HFHSD + Lir.).



Slika 9. Rezovi bubrega obojeni periodičnom kiselinom po Schiffu (PAS). Reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega obojenih PAS-om. Uvećanje objektiva: 40 ×. BC, Bowmanova čahura; vrhovi strelica označavaju zadebljanje BC; Ctrl., kontrolna skupina; HFHSD, skupina na prehrani s visokim udjelom masti i šećera; HFHSD + Metf., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji metforminom; HFHSD + Lir., skupina hranjena HFHSD na terapiji liraglutidom; Ž, ženke; M, mužjaci. # – $P < 0,05$, ## – $P < 0,01$ statistički značajna razlika između naznačenih skupina ženki; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ statistički značajna razlika između naznačenih skupina mužjaka (Kruskal-Wallis ANOVA, nakon čega slijedi Mann-Whitney test). Grafovi pokazuju srednju vrijednost ± SD. Mjerilo = 20 μm.

5.5. Utjecaj metformina i liraglutida na stupanj glomeruloskleroze u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera

Osim u ženki štakora liječenih liraglutidom, nije zabilježena značajna razlika u glomerularnom zbroju među skupinama.

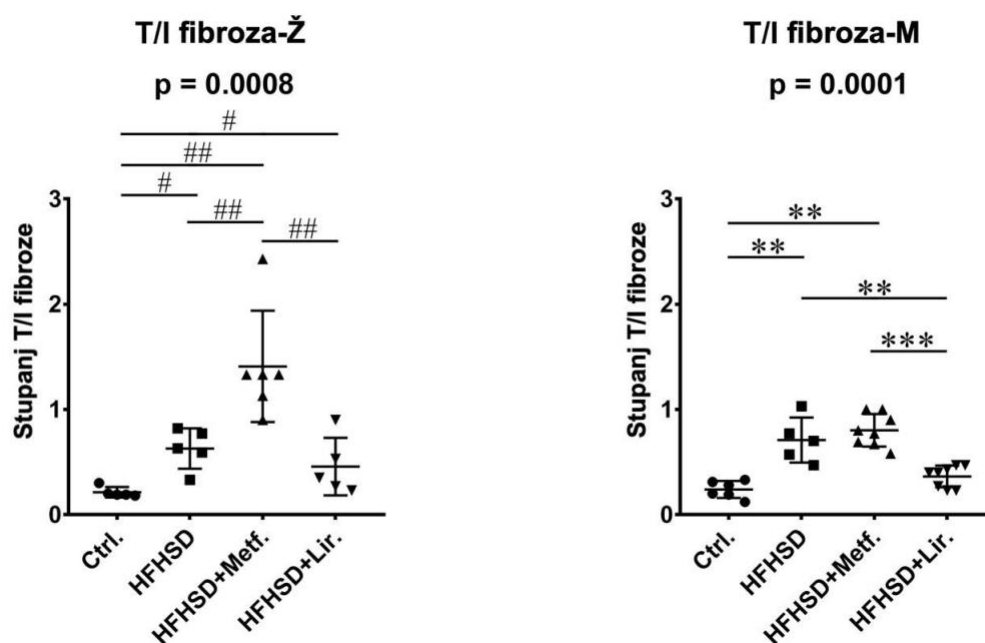
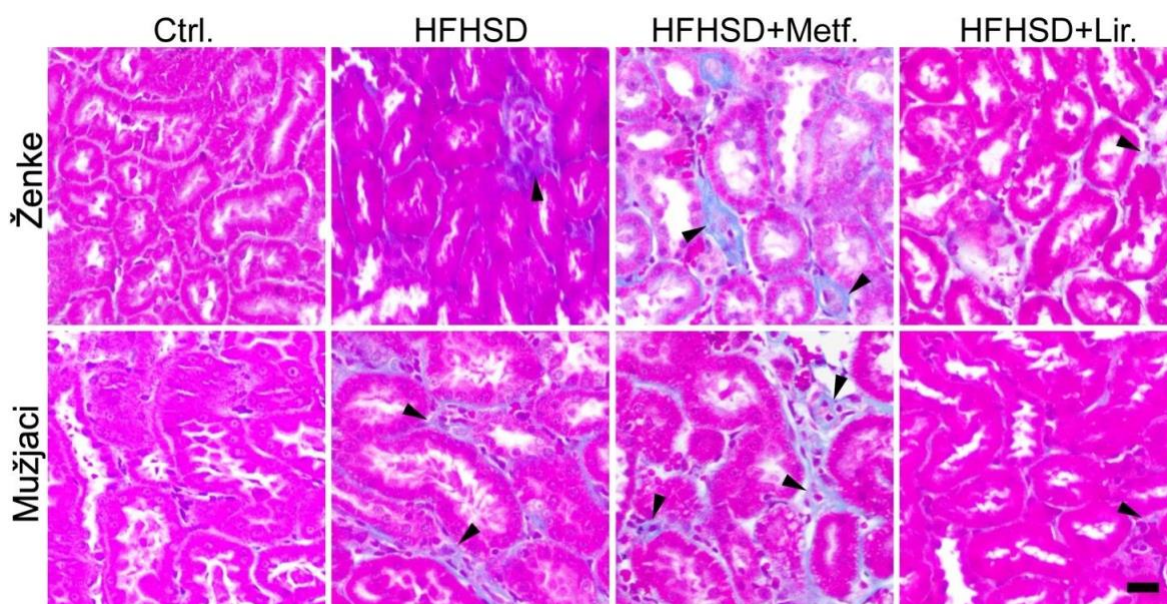
U navedenoj je skupini primijećeno značajno smanjenje glomerularnoga zbroja u usporedbi sa svim ostalim skupinama ženskoga spola ($P = 0,0157$ u odnosu na Ctrl; $P = 0,0119$ u odnosu na HFHSD i $P = 0,0080$ u odnosu na HFHSD + Metf.).

5.6. Utjecaj metformina i liraglutida na stupanj tubulointersticijske fibroze u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera

Prehrana s visokim udjelom masti i šećera uzrokovala je tubulointersticijsku fibrozu u bubrezima štakora oba spola – u mužjaka (Ctrl. u odnosu na HFHSD, $P = 0,0081$) i ženki (Ctrl. u odnosu na HFHSD, $P = 0,0119$; Slika 10.).

Terapija metforminom uz HFHSD također je značajno povećala stupanj fibroze u bubrezima mužjaka i ženki štakora u usporedbi s kontrolnim skupinama (Ctrl. u odnosu na HFHSD + Metf.; u mužjaka $P = 0,0024$ i u ženki $P = 0,0074$). Nadalje, u ženki štakora metformin je uz HFHSD čak značajno povećao postotak fibroznih lezija u usporedbi sa skupinom HFHSD ($P = 0,0075$).

Suprotno tome, liraglutid je uz HFHSD značajno smanjio stupanj tubulointersticijske fibroze u mužjaka štakora ($P = 0,0063$ u odnosu na HFHSD i $P = 0,0009$ u odnosu na HFHSD + Metf.).



Slika 10. Promjene u stupnju tubulointersticijske fibroze povezane s lijekovima. Reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega obojenih trikromnim bojanjem po Malloryju. Uvećanje objektiva: 40 ×. T/I, tubulointersticijski; vrhovi strelica označavaju T/I fibrozu; Ctrl., kontrolna skupina; HFHSD, skupina na prehrani s visokim udjelom masti i šećera; HFHSD + Metf., skupina hranjena HFHSD na terapiji metforminom; HFHSD + Lir., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji liraglutidom; Ž, ženke; M, mužjaci. # – P < 0,05, ## – P < 0,01 statistički značajna razlika između naznačenih skupina ženki; ** – P < 0,01, *** – P < 0,001 statistički značajna razlika između naznačenih skupina mužjaka (Kruskal-Wallis ANOVA, nakon čega slijedi Mann-Whitney test). Grafovi pokazuju srednju vrijednost ± SD. Mjerilo = 20 μm.

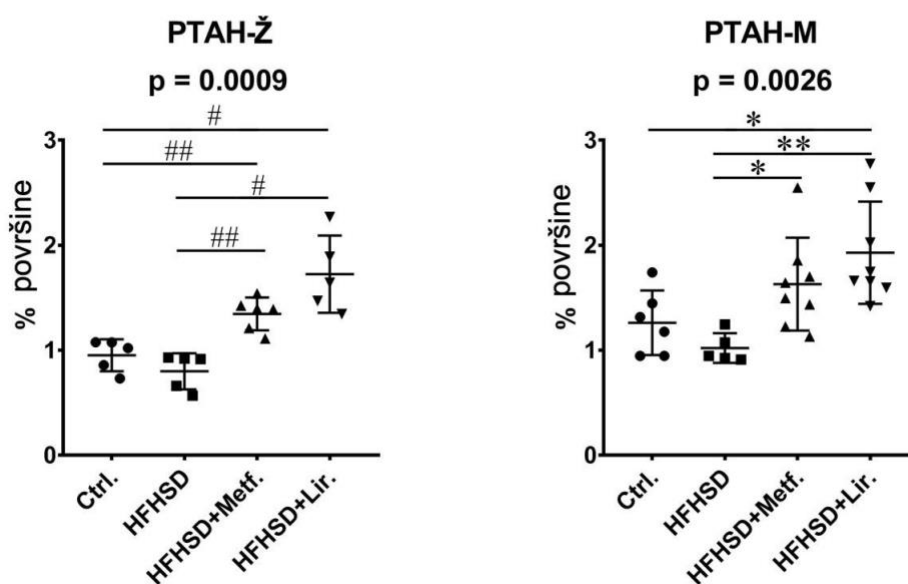
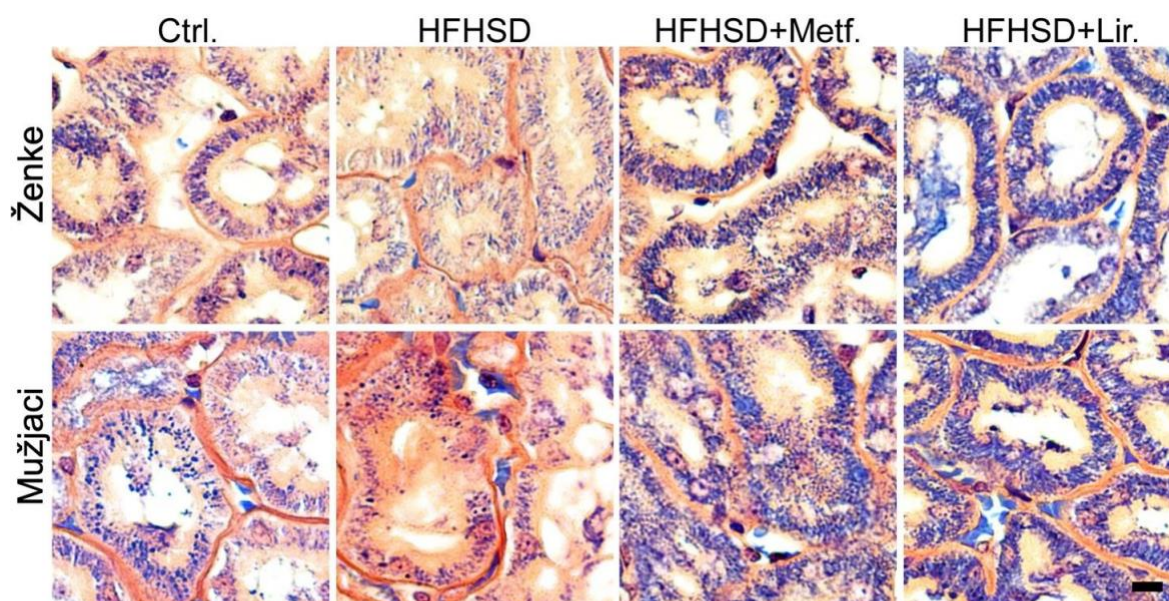
5.7. Utjecaj metformina i liraglutida na mitohondrije u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera

Prehrana s visokim udjelom masti i šećera nije uzrokovala značajne promjene u postotku područja obuhvaćenoga mitohondrijima (Slika 11.).

Međutim, terapija metforminom u štakora oba spola koji su hranjeni HFHSD-om značajno je povećala postotak površine histoloških presjeka bubrega obuhvaćenog mitohondrijima – u ženki ($P = 0,0081$ u odnosu na Ctrl.; $P = 0,0081$ u odnosu na HFHSD) te u mužjaka štakora ($P = 0,0104$ u odnosu na HFHSD).

Jednak je učinak utvrđen i za liraglutid – u ženki ($P = 0,0122$ u odnosu na Ctrl.; $P = 0,0122$ u odnosu na HFHSD) te u mužjaka ($P = 0,0168$ u odnosu na Ctrl.; $P = 0,0043$ u odnosu na HFHSD).

Učinci metformina i liraglutida očito nisu ovisili o spolu štakora.



Slika 11. Promjene u brojnosti mitohondrija povezana s lijekovima. Reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega obojenih fosfovolframskom kiselinom i hematoksilinom (PTAH). Uvećanje objektiva: 40 ×. Ctrl., kontrolna skupina; HFHSD, skupina na prehrani s visokim udjelom masti i šećera; HFHSD + Metf., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji metforminom; HFHSD + Lir., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji liraglutidom; Ž, ženke; M, mužjaci. # – P < 0,05, ## – P < 0,01 statistički značajna razlika između naznačenih skupina ženki; * – P < 0,05, ** – P < 0,01 statistički značajna razlika između naznačenih skupina mužjaka (Kruskal-Wallis ANOVA, nakon čega slijedi Mann-Whitney test). Grafovi pokazuju srednju vrijednost ± SD. Mjerilo = 20 μm.

5.8. Lokalizacija i izražaj Cx45 i Panx1 u bubrezima štakora na dugotrajnoj prehrani s visokim udjelom masti i šećera

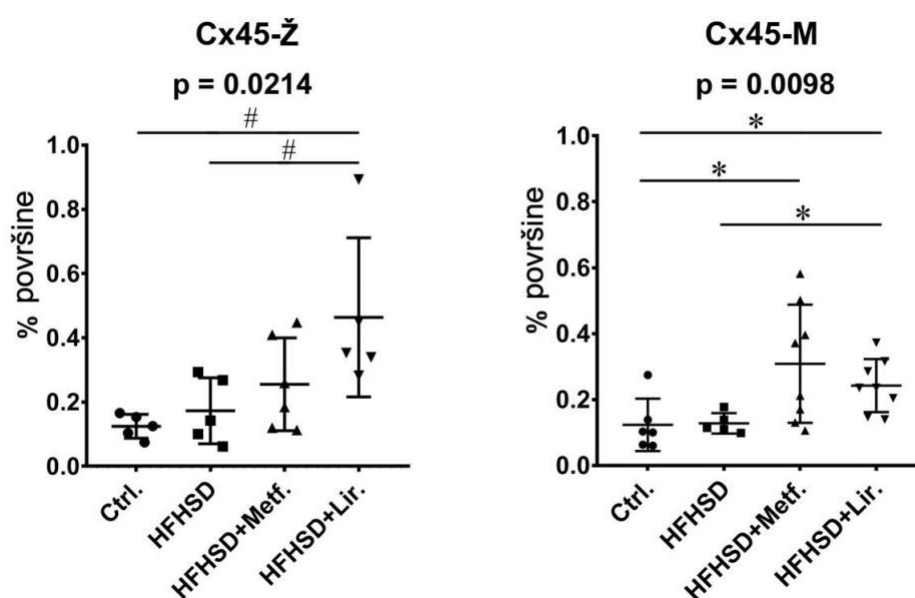
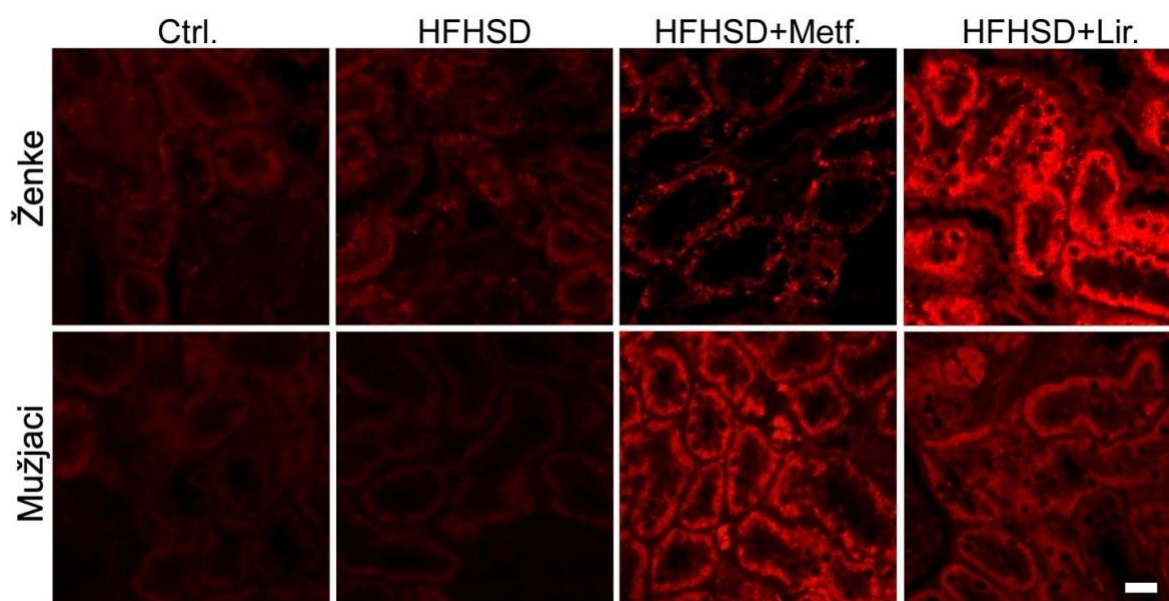
Uočeno je da izražaj Cx45 prevladava u proksimalnim kanalićima s relativno niskom ekspresijom u glomerulima (Slika 12.).

U ženki štakora liraglutid je, uz HFHSD, značajno povećao izražaj Cx45 u usporedbi s Ctrl. i HFHSD skupinom (Ctrl., $P = 0,0122$; HFHSD, $P = 0,0216$). U mužjaka je izražaj Cx45 u skupini HFHSD + Metf. značajno povećan u odnosu na Ctrl. skupinu ($P = 0,0239$). Međutim, nije bilo razlike u izražaju Cx45 između štakora iz Ctrl. i HFHSD skupina za oba spola. Izražaj Cx45 bio je značajno veći u mužjaka iz skupine HFHSD + Lir. u usporedbi s Ctrl. ($P = 0,0168$) i HFHSD skupinom ($P = 0,0103$).

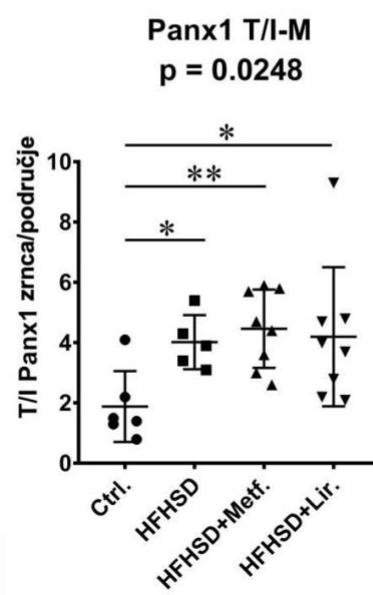
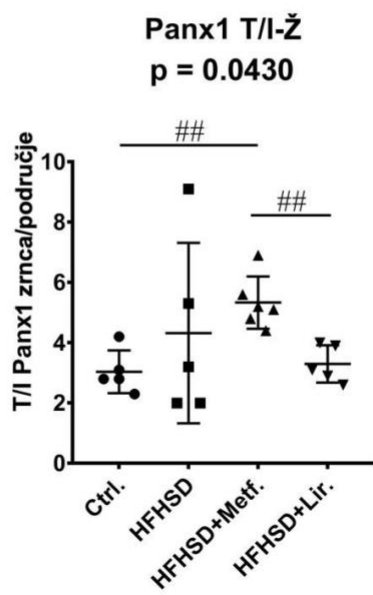
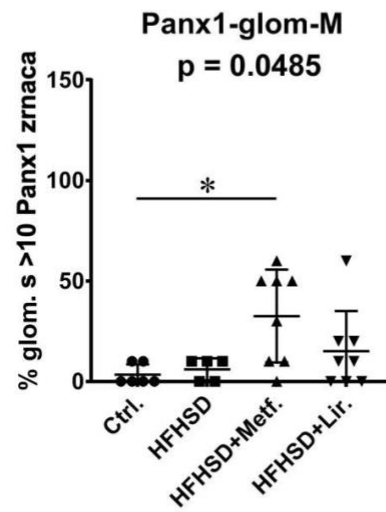
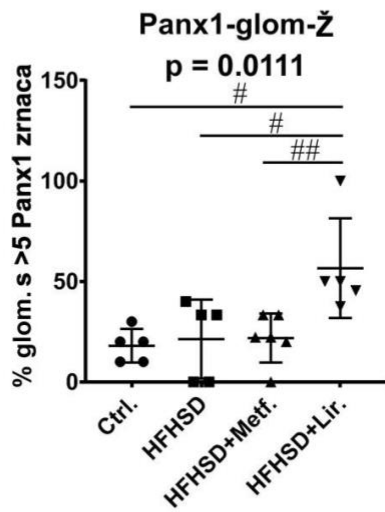
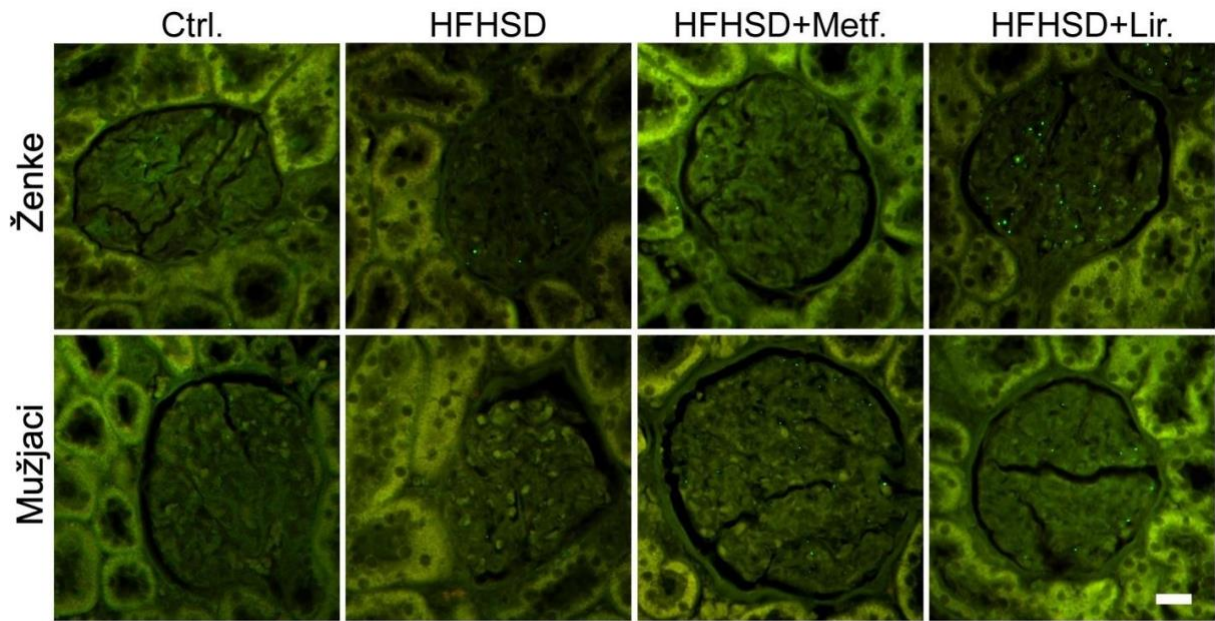
Tijekom ovoga istraživanja zapaženo je da je Panx1 prvenstveno bio izražen u glomerulima. Osim u glomerulima, izražen je u tubulima s prevladavanjem izražaja u distalnom zavijenom kanaliću. Unutar intersticija i na endotelu krvnih žila izražaj Panx1 vrlo je nizak.

U glomerulima je izražaj Panx1 bio značajno veći u mužjaka liječenih metforminom u usporedbi s Ctrl. skupinom ($P = 0,0188$; Slika 13.). U glomerulima ženki štakora izražaj Panx1 bio je najveći u skupini HFHSD + Lir. ($P = 0,0114$ u odnosu na Ctrl; $P = 0,0204$ u odnosu na HFHSD i $P = 0,0077$ u odnosu na HFHSD + Metf.).

U tubulima je izražaj Panx1 bio značajno povećan u ženki na terapiji metforminom ($P = 0,0080$ u odnosu na Ctrl. i $P = 0,0081$ u odnosu na HFHSD + Lir.). Tubularni izražaj Panx1 u mužjaka bio je značajno veći u svim skupinama koje su hranjene HFHSD-om u usporedbi s Ctrl. skupinom (HFHSD, $P = 0,0358$; HFHSD + Metf.; $P = 0,0081$ i HFHSD + Lir.; $P = 0,0280$).



Slika 12. Izražaj koneksina 45 (Cx45) u bubrezima pokusnih štakora. Reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega obojenih Cx45-imunohistokemijom. Uvećanje objektiva: 40 ×. Ctrl., kontrolna skupina; HFHSD, skupina na prehrani s visokim udjelom masti i šećera; HFHSD + Metf., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji metforminom; HFHSD + Lir., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji liraglutidom; Ž, ženke; M, mužjaci. # – P < 0,05 statistički značajna razlika između naznačenih skupina ženki; * – P < 0,05 statistički značajna razlika između naznačenih skupina mužjaka (Kruskal-Wallis ANOVA, nakon čega slijedi Mann-Whitney test). Grafovi pokazuju srednju vrijednost ± SD. Mjerilo = 20 μm.



Slika 13. Izražaj paneksina 1 (Pax1) u bubrezima pokusnih štakora. Reprezentativne mikrofotografije rezova bubrega obojenih Pax1-imunohistokemijom. Uvećanje objektiva: 40 ×. Ctrl., kontrolna skupina; HFHSD, skupina na prehrani s visokim udjelom masti i šećera; HFHSD + Metf., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji metforminom; HFHSD + Lir., skupina hranjena HFHSD-om na terapiji liraglutidom; Ž, ženke; M, mužjaci. # – $P < 0,05$, ## – $P < 0,01$ statistički značajna razlika između navedenih skupina ženki; * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ statistički značajna razlika između naznačenih skupina mužjaka (Kruskal-Wallis ANOVA, nakon čega slijedi Mann-Whitney test). Grafovi pokazuju srednju vrijednost ± SD. Mjerilo = 20 μm.

6. RASPRAVA

Svrha ovoga istraživanja bila je prikazati izražaj različitih koneksina i paneksina 1 u bubrežnoj kori štakora na modelu DM1 te onih na dugotrajnom HFHSD-u. Na DM1 modelu prikazan je utjecaj prehrane s različitim omjerom između omega-6 i omega-3 PUFA-a. Na štakorima hranjenim HFHSD-om pokazana je učinkovitost terapije metforminom ili liraglutidom na bubrežnu patologiju, uz poseban osvrt na razlike u učinkovitosti lijekova s obzirom na spol štakora.

Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, prehrana koja je obogaćena mastima i šećerima ključna je za izazivanje MS-a (85,89). Budući da se MS prvenstveno pojavljuje u starijih osoba nakon višegodišnjih utjecaja čimbenika okoliša (151), u drugom je dijelu istraživanja korišten dugotrajni HFHSD kao model kojim bi se u starih štakora izazvali metabolički poremećaji karakteristični za MS. Matić i suradnici u svom su istraživanju prikazali da istovjetan HFHSD dovodi do pretilosti u štakora oba spola, ali ne utječe na promjenu razine glukoze u krvi (152). Nadalje, Seikrit i suradnici potvrdili su da istovjetan HFHSD model za MS uzrokuje povećanje opsega struka kao znak visceralne pretilosti, no bez značajnih odstupanja u vrijednostima serumskoga kolesterola. Iako ovaj HFHSD model MS-a nije utjecao na razinu glukoze u krvi, uzrokovao je poremećaj tolerancije glukoze što je dokazano testom tolerancije glukoze i testom inzulinske osjetljivosti (151). Vrlo je vjerojatno da sama prehrana u ovom modelu nije bila dovoljna da bi se izazvao poremećaj glukoze natešte te bi uz dugotrajni HFHSD trebalo uključiti niske doze STZ-a.

6.1. Izražaj koneksina i paneksina 1 u bubrezima dijabetičnih štakora i štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera

Glavne izoforme koneksina koje su prisutne u bubrezima su Cx40, Cx43 i Cx45 s tim da je Cx43 najviše proučavan od svih (24). U ovom je istraživanju na DM1 modelu dokazano da je izražaj Cx43 značajno smanjen u dijabetičnih štakora, što je u skladu s rezultatima istraživanja na štakorima s ranim stadijem DM1. U tom je istraživanju korištena Western blot analiza koja je pokazala značajno smanjenje izražaja Cx43 u bubrežnom tkivu dijabetičnih štakora u usporedbi s njihovim nedijabetičnim kontrolama (64). Zeng i suradnici također su primjenom Western blot analize utvrdili da DM1 značajno smanjuje izražaj Cx43 u bubrežnom tkivu štakora (24). U prilog tome, u istraživanju na kulturi stanica opisano je da su razine mRNA i proteina Cx43 značajno smanjene u glomerularnim mezangijskim stanicama štakora koje su bile izložene visokim koncentracijama glukoze (63). Međutim, Hills i suradnici su u svom

istraživanju pokazali drukčije rezultate. U bioptičkom materijalu bubrega, dobivenom od pacijenata s DN-om, dokazali su značajno povećanje tubularnoga izražaja Cx43 (153). Različiti tip DM-a (tip 1 u odnosu na tip 2) mogao bi objasniti razlike u rezultatima prikazanih istraživanja jer je u svima s istovjetnim rezultatima korišten model DM1, a Hills i suradnici nisu naveli koji su tip DM-a imali bolesnici s DN-om. Zbog veće prevalencije DM2 vrlo vjerojatno su bolesnici s DN-om imali upravo tip 2 DM-a. Podatci iz literature također podupiru navedeno objašnjenje. Na pretilim štakorima s DM2 Western blot analiza nije otkrila značajnu promjenu u razini izražaja Cx43 u bubrezima (65). Međutim, u istraživanju na bioptičkim uzorcima bubrega bolesnika s DM2 i DN utvrđeno je smanjenje izražaja Cx43 u podocitima (66). Stoga visoke koncentracije glukoze vrlo vjerojatno različito utječu na izražaj koneksina (povećanje ili smanjenje izražaja), što je u ovisnosti ne samo o tipu DM-a nego i o vrsti stanica u kojoj su koneksini izraženi. U ovom je istraživanju na DM1 modelu dokazana imunoreaktivnost Cx43 u stanicama proksimalnih zavijenih kanalića štakora. Jasno je da sve stanice u fiziološkim uvjetima ne izražavaju jednake izoforme koneksina niti DM mijenja u svim vrstama stanica razinu izražaja koneksina na istovjetan način (12,17). Smanjenje izražaja Cx43 zabilježeno je u glomerularnim mezangijskim stanicama, podocitima (63,66) te stanicama proksimalnih zavijenih kanalića, a povećanje izražaja u stanicama sabirnih cjevčica i kanalića (bez navođenja jesu li proksimalni ili distalni) (15,153). Uz vrstu stanica sigurno i vrsno specifične razlike utječu na opisane suprotne učinke visokih koncentracija glukoze na izražaj koneksina. Za potvrdu su svakako potrebna nova istraživanja.

Visoka koncentracija glukoze sprječava međustaničnu komunikaciju koja se odvija tijesnim spojevima (16), utječe na sintezu proteina (154) te može mijenjati transkripciju i translaciju gena koji kodiraju koneksine (63). Međutim, još nije sasvim jasno definirano kako visoka koncentracija glukoze utječe na sintezu koneksina. Hiperglikemija može dovesti do smanjenja njihove sinteze jer uzrokuje smanjenje sinteze mRNA i proteina (67). S druge strane, moguće je da se u stanjima s visokom koncentracijom glukoze poveća sinteza koneksina, što bi bila kompenzacija za hiperglikemijom narušenu međustaničnu komunikaciju. Tako bi veći broj koneksina bio na raspolaganju za formiranje tijesnih spojeva, ali se sâm proces formiranja, zbog hiperglikemijom uzrokovanoga gubitka međustanične adhezivnosti, ne bi mogao pravilno izvršiti (16,153,154).

U manjem je broju istraživanja prikazan utjecaj DM-a na izražaj Cx40 i Cx45 u bubrezima. Zeng i suradnici opisali su, uz Cx43, i promjenu izražaja Cx40 i Cx45 na modelu

DM1. U štakora s DN-om dokazali su značajno smanjenje izražaja Cx40 (24). Taj je nalaz usporediv s rezultatima ovoga istraživanja gdje je pokazano značajno smanjenje izražaja Cx40 u štakora s DM1. U njihovom je istraživanju izražaj Cx45 također bio značajno smanjen u dijabetičnih štakora (24). Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali promjenu u razini izražaja Cx45 u bubrezima štakora s DM1 niti u bubrezima štakora hranjenih HFHSD-om.

Različite izoforme koneksina mogu biti koeksprimirane u istoj stanici. Poznato je da su Cx40 i Cx43 često zajedno izraženi u stanicama kardiovaskularnoga sustava te da sudjeluju u formiranju heteromernih/heterotipnih kanala. Ovisno o tome koji je od ta dva koneksina dominantno izražen u stanici, mijenjaju se i svojstva tijesnoga spoja. Najvažniji čimbenik koji utječe na to koji je koneksin zastupljeniji, odnosno kakav je omjer izražaja Cx40 i Cx43, stanično je okruženje (155). Time bi se moglo objasniti zašto pojedina istraživanja na različitim vrstama životinja i modelima DM-a pokazuju drukčije rezultate imunoekspresije koneksina.

Paneksinski kanali važni su u različitim metaboličkim poremećajima, uključujući DM (31,156). Nažalost, još je uvijek mali broj istraživanja koja opisuju povezanost između izražaja Panx1 i DM-a. Pretilost je jedan od glavnih čimbenika za razvoj inzulinske rezistencije i DM-a. Uz to je i glavna sastavnica MS-a. Dokazano je da je izražaj Panx1 u visceralnom masnom tkivu pretilih osoba povećan te da korelira sa stupnjem inzulinske rezistencije i vrijednostima glukoze natašte (30). U membranama sinaptosoma rožnice u oboljelih od DM2 utvrđen je povećani izražaj Panx1 (33). Navedeni su nalazi usporedivi s rezultatima ovoga istraživanja gdje je uočeno značajno povećanje izražaja Panx1 u kanalčićima bubrega dijabetičnih štakora te mužjaka štakora hranjenih HFHSD-om, što bi moglo ukazivati na njegovu ulogu u različitim mehanizmima koji su povezani s navedenim metaboličkim poremećajima, poput upale, endotelne disfunkcije i fibroze (87). Proupalni su učinci Panx1 već jako dobro poznati (32), a pojedina nešto novija istraživanja ukazala su na njegove profibrotične učinke (28). Uloga Panx1 u bubrezima još uvijek nije u potpunosti jasna. Poznato je da sudjeluje u patofiziologiji inzulinske rezistencije te je važan za regulaciju krvnoga tlaka (31).

Očito je da visoka koncentracija glukoze utječe na razinu izražaja Panx1 u različitim tkivima i vrstama stanica. U ovom je istraživanju po prvi put opisan utjecaj DM1 i HFHSD-a na imunoekspresiju Panx1 u bubrezima. Zanimljivo, najveća razina izražaja Panx1 u štakora s DM1 zabilježena je u stanicama distalnih zavijenih kanalčića u kojima se Panx1 rijetko susreće. To bi moglo biti povezano s izraženom vakuolizacijom stanica distalnih zavijenih kanalčića i oštećenjima koja su primijećena u DM1 modelima (143,157) gdje je vjerojatno došlo do

povećane propusnosti stanične membrane. U ovom istraživanju na štakorima hranjenim HFHSD-om najveći izražaj Panx1 opisan je u glomerulima, a tek potom u stanicama distalnih zavijenih kanalića.

6.2. Utjecaj prehrane bogate polinezasićenim masnim kiselinama te terapije metforminom i liraglutidom na izražaj koneksina i paneksina 1 u bubrezima štakora

Prema dosadašnjim podacima iz literature malo se zna o utjecaju prehrane bogate PUFA-ama na izražaj koneksina u oboljelih od DM-a. Opisan je samo učinak n-3 PUFA-a na izražaj miokardnoga Cx43, koji je u navedenim istraživanjima pridonio poboljšanju srčane funkcije (108,109). U ovom su istraživanju prvi put prikazane promjene bubrežne imunoekspresije koneksina u ovisnosti o suplementaciji PUFA-a u prehrani dijabetičnih štakora.

Rezultati ovoga istraživanja na modelu DM1 dokazali su da dodatak n-3 PUFA-a u prehrani štakora uzrokuje značajno povećanje bubrežnoga izražaja Cx43 u dijabetičnih životinja. Ovi se rezultati djelomično slažu s nalazima istraživanja Zhukovske i suradnika u kojem su uočene značajne promjene u razini izražaja Cx43 u miokardu dijabetičnih štakora čija je prehrana bila obogaćena n-3 PUFA-ama. Međutim, u njihovom istraživanju, u kojem je također korišten DM1 model, dobrobit prehrane bogate n-3 PUFA-ama povezana je sa smanjenjem povišenih razina izražaja Cx43 (109). Prema tome, očito je da postoji neslaganje oko toga kako n-3 PUFA-e utječu na razinu Cx43 u različitim tkivima. Također, različit učinak n-3 PUFA-a na izražaj Cx43 uočava se i u istim tkivima. U štakora s DM2 razina izražaja Cx43 u miokardu povećana je u usporedbi s nedijabetičnim životinjama. Budući da je prehrana obogaćena n-3 PUFA-ama dovela do još značajnijega povećanja izražaja Cx43, njeni su blagotvorni učinci objašnjeni povećanjem omjera između fosforiliranoga i ukupnoga Cx43. Nadalje, u istome istraživanju dodatak n-3 PUFA-a u prehrani povećao je razinu ukupnoga i fosforiliranoga Cx43 u miokardu u usporedbi s dijabetičnim životinjama (108). Dobro je poznato da PUFA-e mijenjaju izražaj, distribuciju i posttranslacijsku modifikaciju koneksina, ali točan mehanizam još uvijek nije poznat (95).

Smatra se da PUFA-e smanjuju kardiovaskularni rizik te imaju blagotvorne učinke na pojedine metaboličke poremećaje poput DM-a (95,101,158). Bubrežna se funkcija u osoba

oboljelih od DM-a poboljšava zbog smanjenja patoloških strukturnih promjena, uključujući glomerulosklerozu i tubularnu fibrozu (103). Povoljni učinci suplementacije PUFA-ama dokazani su u bolesnika oboljelih od DM-a (101) te na raznim životinjskim modelima DM-a (102,103,106). Pacijenti s DM2 te visokim udjelom ukupnih i n-3 PUFA-a u eritrocitima imali su značajno manji rizik smanjenja bubrežne funkcije u ispitivanom razdoblju od četiri godine (101). Repičino ulje, koje sadrži n-3 PUFA-e, spriječilo je razvoj DN-a u štakora s DM1 (103), dok je prehrana s niskim omjerom n-6/n-3 produljila preživljenje nepretilih dijabetičnih (engl. *non-obese diabetic*, NOD) miševa u modelu DM1 (106).

Iako u većini istraživanja nije dokazan utjecaj n-6 PUFA-i na izražaj koneksina (105,159), ovo je istraživanje na DM1 štakorskom modelu pokazalo povezanost s izražajem Cx43 i Cx45 u bubrezima štakora. Učinak suplementacije n-6 PUFA-ama, odnosno prehrane s visokim n-6/n-3 omjerom, na izražaj Cx43 usporediv je s učinkom n-3 PUFA-a jer su obje dovele do značajnoga povećanja njegovoga izražaja u odnosu na dijabetičnu skupinu štakora. Stoga bi se moglo zaključiti da suplementacija n-6 PUFA-ama može djelovati protektivno na bubrege, slično djelovanju n-3 PUFA-i. U prilog tome, Puebla i suradnici opisali su povoljan učinak LA-e, jedne od n-6 PUFA-i, te su ga povezali s povećanjem razine izražaja Cx43 u epitelnim stanicama želuca (160).

Što se tiče Cx45, u ovom istraživanju na dijabetičnim štakorima uočeno je da suplementacija s n-6 PUFA-ama dovodi do značajnoga smanjenja njegovog izražaja, i to u usporedbi s kontrolnom i dijabetičnom skupinom. Budući da nije bilo značajne razlike između tih dviju skupina, može se zaključiti da n-6 PUFA-e nemaju blagotvoran učinak, već i pogoršavaju bubrežnu funkciju u štakora s DM1.

U pokusu sa štakorima hranjenim HFHSD-om ovdje se dokazalo da je izražaj Cx45 ovisan o spolu i primijenjenoj terapiji – u mužjaka štakora liječenih metforminom razina izražaja Cx45 bila je najveća, dok je u ženki liraglutid imao jednak učinak. Već u nekim ranijim istraživanjima opisano je da lijekovi mijenjaju izražaj koneksina u kardiovaskularnom sustavu (124,142). Metformin i liraglutid povećali su razinu izražaja Cx43 – metformin *in vitro* u srčanim stanicama (124) te liraglutid u srčanim stanicama pretilih miševa s MS-om koji je bio izazvan s HFD-om (142). Razlike u spolu mogle bi biti posljedica sporije tubularne eliminacije liraglutida kod jedinki ženskoga spola (129), što bi pak moglo dovesti do produljenoga učinka liraglutida u bubrezima. Povećanje tubularnoga izražaja Cx45 u kanalčićima štakora liječenih liraglutidom koji su hranjeni HFHSD-om moglo bi se barem djelomično objasniti sposobnošću liraglutida

da uspostavi poremećenu homeostazu ER-a. Naime, HFD uzrokuje ER-stres te utječe na presavijanje i promet proteina, uključujući koneksine, što dovodi do nakupljanja pogrešno savijenih proteina. Taj proces u konačnici može uzrokovati apoptozu i staničnu smrt (102,161). Nadalje, ER-stres može pokrenuti mehanizme neapoptotske stanične smrti koji su karakterizirani pojačanom autofagijom (162). Brojna istraživanja dokazala su da liraglutid i drugi GLP-1-analozi imaju povoljan učinak na ER-stres u različitim tkivima i modelima (102,134,163–166). Terapija liraglutidom, dovodeći do poboljšanja oštećene funkcije ER-a, mogla bi djelovati protektivno te omogućiti pravilno presavijanje koneksina što bi rezultiralo nižom stopom onih koji su nepravilno presavijeni i tako predviđeni za razgradnju autofagijom. Metformin, koji također dovodi do povećanja izražaja Cx45, vrlo vjerojatno ima slično djelovanje. Dokazano je da smanjuje ER-stres te inhibira putove autofagije u mononuklearnim stanicama periferne krvi pacijenata oboljelih od DM2 (167). Kao potvrda gore navedenom, Kawakami i suradnici pokazali su da ER-stres potiče autofagiju u stanicama proksimalnih kanalića (162). Upravo se u tim stanicama dokazalo povećanje izražaja Cx45 nakon primjene metformina i liraglutida, što upućuje na to da bi ovi lijekovi mogli smanjiti razinu ER-stresa te autofagiju koneksina.

Osim povezanosti suplementacije n-6 PUFA-ama s izražajem koneksina, dokazan je i njen utjecaj na izražaj paneksina. U relativno novijem istraživanju prikazano je da metaboliti n-6 PUFA-i ublažavaju cerebralnu ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu tako što inhibiraju Panx1-kanale (168). U ovom istraživanju dokazano je da štakori s visokim omjerom n-6/n-3 PUFA-i u prehrani imaju smanjeni izražaj Panx1 u odnosu na dijabetičnu skupinu životinja, što bi moglo ukazivati na povoljan učinak n-6 PUFA-i. Međutim, svakako su potrebna daljnja istraživanja koja bi objasnila sva uočena neslaganja oko djelovanja n-6 PUFA-i u oboljelih od DM-a. Do sada se tek manji broj istraživanja bavio proučavanjem učinaka n-6 PUFA-i u prehrani oboljelih od DM-a. U istraživanju Kopál i suradnika dodatak n-6 PUFA-i u prehrani štakora s DM1 doveo je do povećanja oksidativnoga stresa te je tako potvrđen njihov prooksidativan učinak (100). Ne samo da n-6 PUFA-e pridonose oksidacijskom oštećenju (100), već povećavaju inzulinsku rezistenciju i rizik od pretilosti. Svi ti čimbenici zajedno sudjeluju u patogenezi DM-a (97). S druge strane, pojedina istraživanja opisala su i povoljne učinke prehrane obogaćene n-6 PUFA-ama (94,160,169). Uzimajući u obzir njihove proupalne, protrombotske i prooksidativne učinke (100), potreban je oprez pri donošenju zaključaka o njihovom eventualno korisnom djelovanju u oboljelih od DM-a.

6.3. Patohistološke promjene u bubrezima štakora hranjenih prehranom s visokim udjelom masti i šećera uz terapiju metforminom i liraglutidom

Najznačajnija patološka promjena koja je pronađena u bubrezima štakora hranjenih s HFHSD-om bila je izražena tubulointersticijska fibroza, jedna od promjena koje su karakteristične i za MS. Za MS karakteristično je oštećenje glomerula koje uključuje proširenje mezangijskoga matriksa, oštećenje podocita i glomeruloskleroza (88). Uz oštećenje glomerula, MS utječe i na druge dijelove nefrona uzrokujući tubularnu atrofiju i intersticijsku fibrozu (76). U ženki HFHSD štakora niti jedan od primijenjenih lijekova nije poboljšao tubulointersticijsku fibrozu, dapače liječenje metforminom čak ju je i pogoršalo. Suprotno tome, u HFHSD-u mužjaka liječenje liraglutidom značajno je umanjilo tubulointersticijsku fibrozu. Ova su saznanja u skladu s onima iz drugih istraživanja koja su pokazala blagotvorne učinke liraglutida u sprječavanju napredovanja tubulointersticijske fibroze kod štakora hranjenih HFD-om (140), u štakorskom DM2 modelu (128) te u mišjem UUO modelu bubrežne fibroze (71). Međutim, pogoršanje tubulointersticijske fibroze uočeno kod HFHSD štakora ženskoga spola liječenih metforminom posve je neočekivano. Vrlo je vjerojatno da terapija metforminom nije bila dovoljna da ublaži uznapredovala oštećenja uzrokovana dugotrajnim HFHSD-om.

Prikazani nalazi tubulointersticijske fibroze mogu se povezati s rezultatima promjene izražaja Cx45 i Panx1 koji su zabilježeni u istraživanju na štakorima hranjenih s HFHSD-om. Uspoređujući ih s promjenama izražaja Cx45 u ovisnosti o primijenjenoj terapiji, može se zaključiti da bi povećanje izražaja Cx45 moglo biti povezano s poboljšanjem tubulointersticijske fibroze jer nije pronađen porast izražaja Cx45 u neliječenih životinja hranjenih HFHSD-om. Također, kako je najveći izražaj Cx45 u ovom istraživanju zabilježen upravo u stanicama proksimalnih zavijenih kanalića, za koje se zna da imaju važnu ulogu u razvoju tubulointersticijske fibroze (170), vrlo je vjerojatno da su promjene izražaja Cx45 povezane s napredovanjem i pogoršanjem tubulointersticijske fibroze.

Značajan porast tubularnoga izražaja Panx1 zabilježen je u ženki štakora hranjenih HFHSD-om i liječenih metforminom, što bi moglo biti povezano s uočenom tubulointersticijskom fibrozom jer je upravo u toj skupini životinja ista bila najizraženija. Iako još uvijek nema podataka koji povezuju Panx1 s bubrežnom fibrozom, nekoliko je istraživanja dokazalo povezanost Panx1 s razvojem fibroze u miokardu (28,171).

Panx1 je potencijalni biljeg ranoga oštećenja bubrega te bi mogao biti terapijski cilj za ublažavanje akutnoga oštećenja bubrega. Inhibiranje Panx1 kanala u miševa s akutnom ozljedom bubrega imalo je blagotvoran učinak (32).

Najznačajnija promjena koja je pronađena u glomerulima bilo je zadebljanje BC-a što je bilo vidljivo u svim skupinama štakora koji su hranjeni HFHSD-om. Terapija lijekovima nije dovela do poboljšanja. Štoviše, metformin je uz HFHSD uzrokovao pogoršanje te doveo do većeg zadebljavanja BC-a, prvenstveno u mužjaka štakora. Upravo u toj skupini životinja uočen je povećan izražaj Panx1 u glomerulima pa se može pretpostaviti da bi mogla postojati povezanost između procesa zadebljavanja BC-a i izražaja Panx1 u bubrežnom tkivu. To potvrđuje i nalaz istraživanja u kojem je dokazano da Panx1 kanali otpuštanjem ATP-a tijekom srčanoga oštećenja aktiviraju fibroblaste koji proizvode kolagen i proteine ECM te tako dovode do fibroze (171). Ovaj bi mehanizam mogao biti odgovoran za aktivaciju glomerularnih PEC-a i njihovu proizvodnju proteina ECM i lučenja kolagena što uzrokuje zadebljanje BC-a.

Stupanj glomerularne skleroze određen na temelju glomerularnoga PAS-zbroja nije se značajno razlikovao među skupinama, osim u skupini ženki hranjenih HFHSD-om koje su liječene liraglutidom. Kod njih je primijećeno značajno smanjenje glomerularnoga PAS-zbroja u odnosu na sve skupine ženskoga spola, pa čak i u usporedbi s kontrolnim životinjama. Ovaj nalaz vrlo se vjerojatno može povezati s poznatim učinkom liraglutida koji dovodi do poboljšanja glomerularnih promjena koje se normalno susreću tijekom starenja (172). Opisane promjene u glomerulima bile su diskretne, a jedini vidljivi znak oštećenja glomerula bilo je zadebljanje BC-a pa se vrlo lako može razumjeti zašto ova vrsta oštećenja nije do sada opisana. U prilog tome, nisu primijećene značajne promjene ukupne bubrežne mase uzrokovane HFHSD-om, a izražene kao postotak tjelesne mase. Međutim, pronađena je nešto veća ukupna masa bubrega u ženki štakora liječenih liraglutidom te manja ukupna masa bubrega u mužjaka liječenih liraglutidom. Prethodna istraživanja na štakorima, koja opisuju oštećenje bubrega povezana s pretilosti, pokazala su da terapija liraglutidom ima povoljan učinak na fibrotične lezije (140).

Spolne razlike u djelovanju liraglutida mogu se objasniti različitim metaboliziranjem lijekova u jedinki muškoga i ženskoga spola. Budući da je kod muškog spola primijećena povećana brzina eliminacije liraglutida (129), skraćeno je vrijeme koje je na raspolaganju liraglutidu da postigne svoj puni terapijski učinak.

Kako se patofiziološki procesi u MS-u i DN-u preklapaju, tako su patohistološke promjene u bubrežima oboljelih od MS-a slične promjenama koje su opisane u DN-u (81). U ranoj fazi DN-a zadebljanje GBM-a vidljivo je elektronskim mikroskopom (56). Također je dokazano da metaboličke promjene u DN-u dovode do zadebljanja BC-a (58). Iako u literaturi još uvijek nema podataka, ove se promjene vrlo vjerojatno pojavljuju u MS-u. Rezultati ovoga istraživanja prvi su koji pokazuju zadebljanje BC-a u ovisnosti o HFHSD-u. Štoviše, uočeno je da debljina BC-a ovisi o spolu, ali i o vrsti primijenjene terapije. Tako je metformin uz HFHSD značajno povećao debljinu BC-a u mužjaka štakora u usporedbi sa svim ostalim skupinama mužjaka. Za spol specifičan učinak metformina već je utvrđen u istraživanju u kojem je metformin spriječio razvoj neuropatske boli, ali samo kod miševa muškoga spola (116). Opisane spolne razlike u djelovanju metformina mogu biti povezane s različitom razinom izražaja OCT2 u proksimalnim zavijenim kanalicima čiji je izražaj veći u mužjaka nego u ženki štakora (118,119). Budući da bubrežni OCT2 posreduje u izlučivanju metformina urinom, veći izražaj OCT2 u jedinki muškoga spola povećava bubrežnu eliminaciju metformina te smanjuje njegovu razinu u plazmi. To rezultira većom koncentracijom metformina u bubrežnom tkivu u odnosu na koncentraciju u plazmi te dovodi do nakupljanja metformina u bubrežima mužjaka (118). Dodatni su čimbenici koji tome pridonose: usporena tubularna sekrecija metformina te produljeno vrijeme izlaganja zbog bazolateralne lokalizacije OCT2 (119). Povećana koncentracija metformina u bubrežnom tkivu svakako može pogoršati bubrežno oštećenje u mužjaka. Uz to, izražaj OCT2 znatno je veći u pretilih miševa koji su hranjeni HFD-om (119) pa HFHSD ima dodatan učinak na oštećenje bubrega u mužjaka štakora na terapiji metforminom.

Nisu svi rezultati ovoga istraživanja na štakorima hranjenim HFHSD-om specifični za spol. U proksimalnim zavijenim kanalicima štakora oba spola hranjenih HFHSD-om, koji su bili na terapiji metforminom i liraglutidom, utvrđen je porast u broju mitohondrija od približno 50 %. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima brojnih istraživanja koja povezuju metformin i liraglutid s biogenezom, funkcijom mitohondrija te smanjenjem oksidativnoga stresa u mitohondrijima različitih organa (173–178).

Prehrana i lijekovi koji se koriste u liječenju DM-a i MS-a svakako imaju barem djelomičan terapijski učinak. Usprkos činjenici što metformin i liraglutid uz dobru regulaciju povišenih koncentracija glukoze imaju i niz drugih pozitivnih učinaka, treba uzeti u obzir i njihova potencijalna nepovoljna djelovanja. Koneksini i paneksini ključni su proteini u

međustaničnoj komunikaciji koja je narušena u osoba oboljelih od DM-a, ali i u onih s MS-om. Osim toga, povezani su s napredovanjem raznih komplikacija navedenih metaboličkih poremećaja, uključujući DN te KBB. Stoga bi zasigurno mogli imati značajnu ulogu u ranom otkrivanju smanjenja bubrežne funkcije ili biti cilj nekih novih terapijskih mogućnosti za oboljele.

7. ZAKLJUČCI

1. Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 najviše su izraženi u stanicama proksimalnih zavijenih kanalića.
2. Model šećerne bolesti tipa 1 dovodi do promjene u izražaja Cx40, Cx43 i Panx1 u bubrezima štakora.
3. Različit omjer između omega-6 i omega-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina u prehrani mijenja izražaj Cx43, Cx45 i Panx1 u bubrezima dijabetičnih štakora.
4. Dugotrajna prehrana hranom s visokim udjelom masti i šećera dovodi do zadebljavanja Bowmanove čahure i tubulointersticijske fibroze u bubrezima štakora.
5. Terapija metforminom i liraglutidom mijenja izražaj Cx45 i Panx1 u bubrezima štakora.
6. Učinak lijekova metformina i liraglutida ovisan je o spolu.

8. LITERATURA

1. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically Oriented Anatomy*. 8. izdanje. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
2. Abed AB, Kavvadas P, Chadjichristos CE. Functional roles of connexins and pannexins in the kidney. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(15):2869–77.
3. Kumaran GK, Hanukoglu I. Identification and classification of epithelial cells in nephron segments by actin cytoskeleton patterns. *FEBS J*. 2020;287(6):1176–94.
4. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. *Anatomija čovjeka*. 2.korigirano izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
5. Sampaio FJ. Renal anatomy. Endourologic considerations. *Urol Clin North Am*. 2000;27(4):585–607.
6. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology*. 15. izdanje. New York: McGraw-Hill Education; 2018.
7. Sobotta J. *Histološki atlas: citologija, histologija, mikroskopska anatomija*. Jastrebarsko: Slap; 2004.
8. Kuehnel W. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. 4. Izdanje. Stuttgart: Thieme; 2003.
9. White KE. Research into the structure of the kidney glomerulus – making it count. *Micron*. 2012;43(10):1001–9.
10. Smeets B, Moeller MJ. Parietal Epithelial Cells and Podocytes in Glomerular Diseases. *Semin Nephrol*. 2012;32(4):357–67.
11. Bell PD, Lapointe JY, Peti-Peterdi J. Macula Densa Cell Signaling. *Annu Rev Physiol*. 2003;65(1):481–500.
12. Prakoura N, Kavvadas P, Chadjichristos CE. Connexin 43: a New Therapeutic Target Against Chronic Kidney Disease. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):985.
13. Davies M. The mesangial cell: A tissue culture view. *Kidney Int*. 1994;45(2):320–7.
14. Dalal R, Bruss ZS, Sehdev JS. *Physiology, Renal Blood Flow and Filtration*. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2022.
15. Hills CE, Bland R, Wheelans DC, Bennett J, Ronco PM, Squires PE. Glucose-evoked alterations in connexin43-mediated cell-to-cell communication in human collecting duct: a possible role in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):F1045–51.
16. 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.
17. Wright JA, Richards T, Becker DL. Connexins and diabetes. *Cardiol Res Pract*.

2012;2012:496904.

18. 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.
19. Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2017;180:144–60.
20. Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH. Cell-Cell Communication in the Kidney Microcirculation. *Microcirculation.* 2012;19(5):451–60.
21. Hamelin R, Allagnat F, Haefliger JA, Meda P. Connexins, Diabetes and the Metabolic Syndrome. *Curr Protein Pept Sci.* 2009;10(1):18–29.
22. Cottrell GT, Burt JM. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2005;1711(2):126–41.
23. Totland MZ, Rasmussen NL, Knudsen LM, Leithe E. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(4):573–91.
24. Zeng O, Li F, Li Y, Li L, Xiao T, Chu C, i sur. Effect of novel gasotransmitter hydrogen sulfide on renal fibrosis and connexins expression in diabetic rats. *Bioengineered.* 2016;7(5):314–20.
25. Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, i sur. Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. *Kidney Int.* 2001;60(1):190–201.
26. Kurtz A. Renal connexins and blood pressure. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):1903–8.
27. Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Krüger O, i sur. Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R371–80.
28. Cogliati B, Menecier G, Willebrords J, Da Silva TC, Maes M, Pereira IVA, i sur. Connexins, pannexins, and their channels in fibroproliferative diseases. *J Membr Biol.* 2016;249(3):199–213.
29. Abudara V, Retamal MA, del Rio R, Orellana JA. Synaptic Functions of Hemichannels and Pannexons: A Double-Edged Sword. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:435.
30. Adamson SE, Meher AK, Chiu YH, Sandilos JK, Oberholtzer NP, Walker NN, i sur. Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes.

Mol Metab. 2015;4(9):610–8.

31. Chiu YH, Schappe MS, Desai BN, Bayliss DA. Revisiting multimodal activation and channel properties of pannexin 1. *J Gen Physiol.* 2018;150(1):19–39.
32. Poudel N, Okusa MD. Pannexins in acute kidney injury. *Nephron.* 2019;143(3):158–61.
33. Cui H, Liu Y, Qin L, Wang L, Huang Y. Increased membrane localization of pannexin1 in human corneal synaptosomes causes enhanced stimulated ATP release in chronic diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(49):e5084.
34. Thomas CC, Philipson LH. Update on Diabetes Classification. *Med Clin North Am.* 2015;99(1):1–16.
35. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(7):377–90.
36. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care.* 2019;42(Suppl 1):S13–28.
37. Kaul K, Tarr JM, Ahmad SI, Kohner EM, Chibber R. Introduction to Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:1–11.
38. Maraschin Jde F. Classification of Diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:12–9.
39. Guthrie RA, Guthrie DW. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Crit Care Nurs Q.* 2004;27(2):113–25.
40. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology. 10. izdanje. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2018.
41. Watada S, Yu YM, Fischman AJ, Kurihara T, Shen CA, Tompkins RG, i sur. Evaluation of Intragastric Vs Intraperitoneal Glucose Tolerance Tests in the Evaluation of Insulin Resistance in a Rodent Model of Burn Injury and Glucagon-Like Polypeptide-1 Treatment. *J Burn Care Res.* 2014;35(1):e66–72.
42. Umpierrez G, Korytkowski M. Diabetic emergencies-ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):222–32.
43. Cashen K, Petersen T. Diabetic Ketoacidosis. *Pediatr Rev.* 2019;40(8):412–20.
44. Freeman J. Management of hypoglycemia in older adults with type 2 diabetes. *Postgrad Med.* 2019;131(4):241–50.
45. Cryer PE, Davis SN, Shamon H. Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26(6):1902–12.
46. Matyukhin I, Patschan S, Ritter O, Patschan D. Etiology and Management of Acute Metabolic Acidosis: An Update. *Kidney Blood Press Res.* 2020;45(4):523–31.

47. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010;376(9735):124–36.
48. Zakin E, Abrams R, Simpson DM. Diabetic Neuropathy. *Semin Neurol*. 2019;39(5):560–9.
49. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(3):139–52.
50. Ravindran S, Kuruvilla V, Wilbur K, Munusamy S. Nephroprotective Effects of Metformin in Diabetic Nephropathy. *J Cell Physiol*. 2017;232(4):731–42.
51. Qi C, Mao X, Zhang Z, Wu H. Classification and Differential Diagnosis of Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. 2017;2017:8637138.
52. Ioannou K. Diabetic nephropathy: is it always there? Assumptions, weaknesses and pitfalls in the diagnosis. *Hormones (Athens)*. 2018;16(4):351–61.
53. Gaitonde DY, Cook DL, Rivera IM. Chronic Kidney Disease: Detection and Evaluation. *Am Fam Physician*. 2017;96(12):776–83.
54. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management. *JAMA*. 2019;322(13):1294–1304.
55. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(12):2032–45.
56. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, *i sur*. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(4):556–63.
57. Jain M. Histopathological changes in diabetic kidney disease. *Clin Queries: Nephrol*. 2012;1(2):127–33.
58. Holderied A, Romoli S, Eberhard J, Konard LA, Devarapu SK, Marschner JA, *i sur*. Glomerular parietal epithelial cell activation induces collagen secretion and thickening of Bowman’s capsule in diabetes. *Lab Invest*. 2015;95(3):273–82.
59. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: Their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;9:279–90.
60. Zhang Y, Ma KL, Gong YX, Wang GH, Hu ZB, Liu L, *i sur*. Platelet Microparticles Mediate Glomerular Endothelial Injury in Early Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(11):2671–95.
61. Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular Response to Injury in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1195–204.
62. Zhang J, Hill CE. Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: Accentuation during diabetes. *Kidney Int*. 2005;68(3):1171–85.

63. Zhang X, Chen X, Wu D, Liu W, Wang J, Feng Z, i sur. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose induces senescence in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1532–42.
64. Satriano J, Mansoury H, Deng A, Sharma K, Vallon V, Blantz RC, i sur. Transition of kidney tubule cells to a senescent phenotype in early experimental diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(2):C374–80.
65. 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.
66. Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Yoshioka T, i sur. Redistribution of connexin43 expression in glomerular podocytes predicts poor renal prognosis in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(9):2472–7.
67. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li AF, Roy S. Downregulation of Connexin 43 Expression by High Glucose Reduces Gap Junction Activity in Microvascular Endothelial Cells. *Diabetes*. 2002;51(5):1565–71.
68. Tozzi M, Larsen AT, Lange SC, Giannuzzo A, Andersen MN, Novak I. The P2X7 receptor and pannexin-1 are involved in glucose-induced autocrine regulation in β -cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):8926.
69. Berchtold LA, Miani M, Diep TA, Madsen AN, Cigliola V, Colli M, i sur. Pannexin-2-deficiency sensitizes pancreatic β -cells to cytokine-induced apoptosis in vitro and impairs glucose tolerance in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;448:108–21.
70. Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2020;66(Suppl 1):S03–9.
71. Li YK, Ma DX, Wang ZM, Hu XF, Li SL, Tian HZ, i sur. The glucagon-like peptide-1(GLP-1) analog liraglutide attenuates renal fibrosis. *Pharmacol Res*. 2018;131:102–11.
72. Stevens PE, Levin A, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2013;158(11):825–30.
73. Toubas J, Beck S, Pageaud AL, Huby AC, Mael-Ainin M, Dussaule JC, i sur. Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(1):F24–F32.
74. Webster AC, Nagler E v, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*.

2017;389(10075):1238–52.

75. Prasad GV. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World J Nephrol.* 2014;3(4):210–9.
76. Alexander MP, Patel TV, Farag YMK, Florez A, Rennke HG, Singh AK. Kidney pathological changes in metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(5):751–9.
77. Samson SL, Garber AJ. Metabolic Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014;43(1):1–23.
78. Joyce T, Chirino YI, Natalia MT, Jose PC. Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders implicated. *Eur J Pharmacol.* 2018;818:554–68.
79. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 2011;9(1):48.
80. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9468):1415–28.
81. Zhang X, Lerman LO. The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Transl Res.* 2017;183:14–25.
82. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017;22(4):365–7.
83. Lim S, Eckel RH. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):32941.
84. Neeland IJ, Ayers CR, Rohatgi AK, Turer AT, Berry JD, Das SR, et al. Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(9):E439–47.
85. Felice JI, Schurman L, McCarthy AD, Sedlinsky C, Aguirre JI, Cortizo AM. Effects of fructose-induced metabolic syndrome on rat skeletal cells and tissue, and their responses to metformin treatment. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;126:202–13.
86. Nashar K, Egan BM. Relationship between chronic kidney disease and metabolic syndrome: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014;7:421–35.
87. Singh AK, Kari JA. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(2):198–203.
88. Kim D, Lee JE, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Park SK. Metformin decreases high-fat diet-induced renal injury by regulating the expression of adipokines and the renal AMP-activated protein kinase/acetyl-CoA carboxylase pathway in mice. *Int J Mol Med.* 2013;32(6):1293–302.
89. Panchal SK, Brown L. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *J Biomed*

Biotechnol. 2011;2011:351982.

90. Gluba A, Mikhailidis DP, Lip GYH, Hannam S, Rysz J, Banach M. Metabolic syndrome and renal disease. *Int J Cardiol.* 2013;164(2):141–50.
91. Šeda O, Křenová D, Oliyarnyk O, Šedová L, Krupková M, Liška F, i sur. Heterozygous connexin 50 mutation affects metabolic syndrome attributes in spontaneously hypertensive rat. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):199.
92. Li L, He L, Wu D, Chen L, Jiang Z. Pannexin-1 channels and their emerging functions in cardiovascular diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;47(6):391–6.
93. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, i sur. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37 Suppl 1:S120–43.
94. Shapiro H, Theilla M, Attal-Singer J, Singer P. Effects of polyunsaturated fatty acid consumption in diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(2):110–21.
95. Puebla C, Retamal MA, Acuña R, Sáez JC. Regulation of Connexin-Based Channels by Fatty Acids. *Front Physiol.* 2017;8:11.
96. Saini RK, Keum YS. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci.* 2018;203:255–67.
97. Simopoulos AP. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients.* 2016;8(3):128
98. Balić A, Vlašić D, Žužul K, Marinović B, Bukvić Mokos Z. Omega-3 Versus Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):741.
99. Sibille KT, King C, Garrett TJ, Glover TL, Zhang H, Chen H, i sur. Omega-6:Omega-3 PUFA Ratio, Pain, Functioning, and Distress in Adults With Knee Pain. *Clinical J Pain.* 2018 ;34(2):182–9.
100. Kopál M, Ondrejovičová I, Deáková Z, Uličná O, Vančová O, Duračková Z, i sur. Effect of PUFA-rich plant oil on risk factors of STZ-induced diabetes in Wistar rats. *Redox Rep.* 2014;19(4):161–9.
101. Chung HF, Long KZ, Hsu CC, Al Mamun A, Jhang HR, Shin SJ, i sur. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory indicators with renal function decline in type 2 diabetes. *Clin Nutr.* 2015;34(2):229–34.
102. Liu HQ, Qiu Y, Mu Y, Zhang XJ, Liu L, Hou XH, i sur. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. *Nutr Res.* 2013;33(10):849–58.

103. Yokoyama M, Tanigawa K, Murata T, Kobayashi Y, Tada E, Suzuki I, i sur. Dietary polyunsaturated fatty acids slow the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin induced diabetic rats. *Nutr Res.* 2010;30(3):217–25.
104. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2018;132:41–8.
105. Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavalie M, Denis I. Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci.* 2006;24(11):3084–90.
106. Kagohashi Y, Otani H. Diet with a low n-6/n-3 essential fatty acid ratio when started immediately after the onset of overt diabetes prolongs survival of type 1 diabetes model NOD mice. *Congenit Anom (Kyoto).* 2010;50(4):226–31.
107. Dlugosova K, Okruhlicova L, Mitasikova M, Sotnikova R, Bernátová I, Weismann P, i sur. Modulation of connexin-43 by omega-3 fatty acids in the aorta of old spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(3):63–9.
108. Radosinska J, Lin H, Hiraishi K, Viczenczová C, Egan Benova T, Szeiff Bacova B, i sur. Modulation of Cardiac Connexin-43 by Omega-3 Fatty Acid Ethyl-Ester Supplementation Demonstrated in Spontaneously Diabetic Rats. *Physiol Res.* 2015;64(6):795–806.
109. Zhukovska A, Shysh A, Bacova B, Radosinska J, Benova T, Viczenczova C, i sur. Heart-protective effect of n-3 PUFA demonstrated in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2014;389(1-2):219–27.
110. Samuels SE, Lipitz JB, Wang J, Dahl G, Muller KJ. Arachidonic acid closes innexin/pannexin channels and thereby inhibits microglia cell movement to a nerve injury. *Dev Neurobiol.* 2013;73(8):621–31.
111. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metab.* 2014;20(6):953–66.
112. Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tian L, i sur. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2421–9.
113. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong J, i sur. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(2):81–98.
114. Zhang S, Xu H, Yu X, Wu Y, Sui D. Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Exp Ther Med.* 2017;14(1):383–90.
115. Lv Z, Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:191.
116. Inyang KE, Szabo-Pardi T, Wentworth E, McDougal TA, Dussor G, Burton MD, i

- sur. The antidiabetic drug metformin prevents and reverses neuropathic pain and spinal cord microglial activation in male but not female mice. *Pharmacol Res.* 2019;139:1–16.
117. Narasimhan A, Chinnaiyan M, Karundevi B. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Eur J Pharmacol.* 2015;761:391–7.
118. Ma YR, Qin HY, Jin YW, Huang J, Han M, Wang XD, i sur. Gender-related differences in the expression of organic cation transporter 2 and its role in urinary excretion of metformin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2016;41(5):559–65.
119. Gai Z, Visentin M, Hiller C, Krajnc E, Li T, Zhen J, i sur. Organic cation transporter 2 overexpression may confer an increased risk of gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(9):5573–80.
120. Lazarus B, Wu A, Shin JI, Sang Y, Alexander GC, Secora A, i sur. Association of metformin use with risk of lactic acidosis across the range of kidney function: A community-based cohort study. *JAMA Intern Med.* 2018;178(7):903–10.
121. De Broe ME, Kajbaf F, Lalau JD. Renoprotective effects of metformin. *Nephron.* 2018;138(4):261–74.
122. Crowley MJ, Diamantidis CJ, McDuffie JR, Cameron CB, Stanifer JW, Mock CK, i sur. Clinical Outcomes of Metformin Use in Populations With Chronic Kidney Disease, Congestive Heart Failure, or Chronic Liver Disease. *Ann Intern Med.* 2017;166(3):191–200.
123. Hippisley-Cox J, Coupland C. Diabetes treatments and risk of amputation, blindness, severe kidney failure, hyperglycaemia, and hypoglycaemia: open cohort study in primary care. *BMJ.* 2016;352:i1450.
124. Wang GY, Bi YG, Liu XD, Zhao Y, Han JF, Wei M, i sur. Autophagy was involved in the protective effect of metformin on hyperglycemia-induced cardiomyocyte apoptosis and Connexin 43 downregulation in H9c2 cells. *Int J Med Sci.* 2017;14(7):698–704.
125. Li J, Li B, Bai F, Ma Y, Liu N, Liu Y, i sur. Metformin therapy confers cardioprotection against the remodeling of gap junction in tachycardia-induced atrial fibrillation dog model. *Life Sci.* 2020;254:117759.
126. Durden E, Lenhart G, Lopez-Gonzalez L, Hammer M, Langer J. Predictors of glycemic control and diabetes-related costs among type 2 diabetes patients initiating therapy with liraglutide in the United States. *J Med Econ.* 2016;19(4):403–13.
127. Moellmann J, Klinkhammer BM, Onstein J, Stöhr R, Jankowski V, Jankowski J, i sur. Glucagon-Like Peptide 1 and Its Cleavage Products Are Renoprotective in Murine Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2018;67(11):2410–9.

128. Chen P, Shi X, Xu X, Lin Y, Shao Z, Wu R, i sur. Liraglutide ameliorates early renal injury by the activation of renal FoxO1 in a type 2 diabetic kidney disease rat model. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;137:173–82.
129. Cataldi M, Muscogiuri G, Savastano S, Barrea L, Guida B, Tagliamonte M, i sur. Gender-related issues in the pharmacology of new anti-obesity drugs. *Obes Rev.* 2019;20(3):375–84.
130. Raun K, von Voss P, Gotfredsen CF, Golozoubova V, Rolin B, Knudsen LB. Liraglutide, a Long-Acting Glucagon-Like Peptide-1 Analog, Reduces Body Weight and Food Intake in Obese Candy-Fed Rats, Whereas a Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor, Vildagliptin, Does Not. *Diabetes.* 2007;56(1):8–15.
131. Jacobsen L v., Flint A, Olsen AK, Ingwersen SH. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55(6):657–72.
132. Damholt B, Golor G, Wierich W, Pedersen P, Ekblom M, Zdravkovic M. An Open-Label, Parallel Group Study Investigating the Effects of Age and Gender on the Pharmacokinetics of the Once-Daily Glucagon-Like Peptide-1 Analogue Liraglutide. *J Clin Pharmacol.* 2006;46(6):635–41.
133. Kawanami D, Takashi Y. GLP-1 Receptor Agonists in Diabetic Kidney Disease: From Clinical Outcomes to Mechanisms. *Front Pharmacol.* 2020;11:967.
134. Bretón-Romero R, Weisbrod RM, Feng B, Holbrook M, Ko D, Stathos MM, i sur. Liraglutide Treatment Reduces Endothelial Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance in Patients With Diabetes Mellitus. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(18):e009379.
135. Zhao XY, Yu TT, Liu S, Liu YJ, Liu JJ, Qin J. Effect of liraglutide on endoplasmic reticulum stress in the renal tissue of type 2 diabetic rats. *World J Diabetes.* 2020;11(12):611–21.
136. Drucker DJ. The Ascending GLP-1 Road From Clinical Safety to Reduction of Cardiovascular Complications. *Diabetes.* 2018;67(9):1710–9.
137. Peradze N, Farr OM, Perakakis N, Lázaro I, Sala-Vila A, Mantzoros CS. Short-term treatment with high dose liraglutide improves lipid and lipoprotein profile and changes hormonal mediators of lipid metabolism in obese patients with no overt type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled, cross-over, double-blind clinical trial. *Cardiovasc Diabetol.* 2019;18(1):141.
138. Lin CH, Shao L, Zhang YM, Tu YJ, Zhang Y, Tomlinson B, i sur. An evaluation of liraglutide including its efficacy and safety for the treatment of obesity. *Expert Opin*

Pharmacother. 2020;21(3):275–85.

139. Xu J, Wei G, Wang J, Zhu J, Yu M, Zeng X, i sur. Glucagon-like peptide-1 receptor activation alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via maintenance of endothelial barrier function. *Lab Invest.* 2019;99(4):577–87.

140. Wang C, Li L, Liu S, Liao G, Li L, Chen Y, i sur. GLP-1 receptor agonist ameliorates obesity-induced chronic kidney injury via restoring renal metabolism homeostasis. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193473.

141. Ramadan NM, Malek HA, Rahman KA el, El-Kholy E, Shaalan D, Elkashef W. Liraglutide Effect on Ventricular Transient Outward K⁺ Channel and Connexin-43 Protein Expression. *Expe Clin Endocrinol Diabetes.* 2021;129(12):899–907.

142. Noyan-Ashraf Mohammad H, Shikatani Eric A, Schuiki I, Mukovozov I, Wu J, Li RK, i sur. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. *Circulation.* 2013;127(1):74–85.

143. Vitlov Uljević M, Starčević K, Mašek T, Bočina I, Restović I, Kević N, i sur. Dietary DHA/EPA supplementation ameliorates diabetic nephropathy by protecting from distal tubular cell damage. *Cell Tissue Res.* 2019;378(2):301–17.

144. Starčević K, Filipović N, Galan A, Micek V, Gudan Kurilj A, Mašek T. Hepatic lipogenesis and brain fatty acid profile in response to different dietary n6/n3 ratios and DHA/EPA supplementation in streptozotocin treated rats. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(9):e1701007.

145. Glastras SJ, Chen H, Teh R, McGrath RT, Chen J, Pollock CA, i sur. Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. *PLoS One.* 2016;11(8):e0162131.

146. Maric C, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Glomerulosclerosis and Tubulointerstitial Fibrosis are Attenuated with 17 – Estradiol in the Aging Dahl Salt Sensitive Rat. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(6):1546–56.

147. Yabuki A, Tahara T, Taniguchi K, Matsumoto M, Suzuki S. Neuronal Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetic OLETF Rats. *Exp Anima.* 2006;55(1):17–25.

148. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001;4(1):9.

149. Mead R, Gilmour SG, Mead A. Statistical principles for the design of experiments: applications to real experiments. Cambridge: Cambridge University Press; 2012.

150. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101–5.

151. Seikrit C, Lausberg E, Buhl EM, Gaspar R, Tabi T, Heffer M, i sur. A Hypercaloric Diet Induces Early Podocyte Damage in Aged, Non-Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2021;55(S4):96–112.
152. Matic A, Vuković R, Heffer M, Balog M, Ivić V, Gaspar R, i sur. Sex differences in oxidative stress level and antioxidative enzymes expression and activity in obese pre-diabetic elderly rats treated with metformin or liraglutide. *Croat Med J.* 2021;62(3):215–26.
153. Hills CE, Price GW, Wall MJ, Kaufmann TJ, Chi-Wai Tang S, Yiu WH, i sur. Transforming growth factor beta 1 drives a switch in connexin mediated cell-to-cell communication in tubular cells of the diabetic kidney. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(6):2369–88.
154. Yeshao W, Gu J, Peng X, Nairn AC, Nadler JL. Elevated glucose activates protein synthesis in cultured cardiac myocytes. *Metabolism.* 2005;54(11):1453–60.
155. Cottrell GT, Wu Y, Burt JM. Cx40 and Cx43 expression ratio influences heteromeric/heterotypic gap junction channel properties. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(6):C1469–82.
156. Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2017;180:144–60.
157. Delić Jukić IK, Kostić S, Filipović N, Gudelj Ensor L, Ivandić M, Dukić JJ, i sur. Changes in expression of special AT-rich sequence binding protein 1 and phosphatase and tensin homologue in kidneys of diabetic rats during ageing. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(10):1734–41.
158. Yang LG, Song ZX, Yin H, Wang YY, Shu GF, Lu HX, i sur. Low n-6/n-3 PUFA ratio improves lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and endothelial function in rats using plant oils as n-3 fatty acid source. *Lipids.* 2016;51(1):49–59.
159. Langelier B, Linard A, Bordat C, Lavialle M, Heberden C. Long chain-polyunsaturated fatty acids modulate membrane phospholipid composition and protein localization in lipid rafts of neural stem cell cultures. *J Cell Biochem.* 2010;110(6):1356–64.
160. Puebla C, Cisterna BA, Salas DP, Delgado-López F, Lampe PD, Sáez JC. Linoleic acid permeabilizes gastric epithelial cells by increasing connexin 43 levels in the cell membrane via a GPR40- and Akt-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(5):439–48.
161. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, i sur. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306(5695):457–61.
162. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, i sur. Endoplasmic

reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(9):2665–72.

163. Panagaki T, Michael M, Hölscher C. Liraglutide Restores Chronic ER Stress, Autophagy Impairments and Apoptotic Signalling in SH-SY5Y Cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):16158.

164. Sharma S, Mells JE, Fu PP, Saxena NK, Anania FA. GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy. *PLoS One*. 2011;6(9):e25269.

165. Ren X, Sun L, Wei L, Liu J, Zhu J, Yu Q, i sur. Liraglutide Up-regulation Thioredoxin Attenuated Müller Cells Apoptosis in High Glucose by Regulating Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Eye Res*. 2020;45(10):1283–91.

166. Fu J, Nchambi KM, Wu H, Luo X, An X, Liu D. Liraglutide protects pancreatic β cells from endoplasmic reticulum stress by upregulating MANF to promote autophagy turnover. *Life Sci*. 2020;252:117648.

167. Diaz-Morales N, Iannantuoni F, Escribano-Lopez I, Bañuls C, Rovira-Llopis S, Sola E, i sur. Does Metformin Modulate Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Type 2 Diabetic Peripheral Blood Mononuclear Cells? *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(17):1562–9.

168. Liu Z, Liu Y, Zhou H, Fu X, Hu G. Epoxyeicosatrienoic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory factors and pannexin-1. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):2179–84.

169. Wu JHY, Marklund M, Imamura F, Tintle N, Ardisson Korat AV, de Goede J, i sur. Omega-6 fatty acid biomarkers and incident type 2 diabetes: pooled analysis of individual-level data for 39 740 adults from 20 prospective cohort studies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(12):965–74.

170. Gewin LS. Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule. *Matrix Biol*. 2018;68–69:248–62.

171. Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, i sur. Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(10):H1208–18.

172. Zhang D, Ma M, Liu Y. Protective Effects of Incretin Against Age-Related Diseases. *Curr Drug Deliv*. 2019;16(9):793–806.

173. Pintana H, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. *J Endocrinol*. 2013;218(1):1–11.

174. Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, Jaiwongkam T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, i sur. SGLT2-inhibitor and DPP-4 inhibitor improve brain function via attenuating mitochondrial dysfunction, insulin resistance, inflammation, and apoptosis in HFD-induced obese rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;333:43–50.
175. Karise I, Bargut TC, Del Sol M, AguilaMB, Mandarim-de-Lacerda CA. Metformin enhances mitochondrial biogenesis and thermogenesis in brown adipocytes of mice. *Biomed Pharmacother.* 2019;111:1156–65.
176. Pal S, Maurya SK, Chattopadhyay S, Pal China S, Porwal K, Kulkarni C, i sur. The osteogenic effect of liraglutide involves enhanced mitochondrial biogenesis in osteoblasts. *Biochem Pharmacol.* 2019;164:34–44.
177. Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of mitochondria in the mechanism(s) of action of metformin. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:294.
178. Wu YC, Wang WT, Lee SS, Kuo YR, Wang YC, Yen AJ, i sur. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist attenuates autophagy to ameliorate pulmonary arterial hypertension through Drp1/NOX- and Atg-5/Atg-7/Beclin-1/LC3beta pathways. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3435.

9. SAŽETAK

Metabolički poremećaji kao što su pretilost, šećerna bolest (DM) i metabolički sindrom (MS) utječu na međustaničnu komunikaciju u brojnim tkivima i organima pa tako i u bubrežima. To može rezultirati promjenama u izražaju koneksina i paneksina jer su oni ključni za komunikaciju među stanicama. Suplementacija polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) može ublažiti bubrežna oštećenja uzrokovana DM-om što bi se moglo odraziti na staničnoj razini mijenjanjem izražaja koneksina, odnosno paneksina. Metformin i liraglutid lijekovi su koji se koriste za liječenje oboljelih od DM-a, a zbog svojih pozitivnih metaboličkih učinaka mogu se primijeniti i u terapiji MS-a. Uz to, brojna su istraživanja pokazala da oba lijeka djeluju protektivno na funkciju bubrega.

U istraživanju na DM1 modelu mužjaci Wistar štakora podijeljeni su u četiri grupe na temelju omjera između n-6 i n-3 PUFA-ama u prehrani. Štakori u kontrolnoj (C) i dijabetičnoj (STZ) skupini imali su omjer 7, u STZ+N6 skupini 60, a u skupini (STZ+N3) koja je dobivala 16 % EPA-e i 19 % DHA-e, omjer je bio 1. Za određivanje izražaja Cx40, Cx43, Cx54 i Panx1 u kori bubrega korištena je imunohistokemija. U drugom dijelu istraživanja Sprague-Dawley štakori oba spola podijeljeni su u četiri skupine: standardna prehrana, prehrana s visokim udjelom masti i šećera (HFHSD), HFHSD uz terapiju metforminom i HFHSD uz terapiju liraglutidom. Liječenje je trajalo četrnaest tjedana. Histološke metode korištene su za procjenu patoloških promjena u bubrežima, a imunohistokemija za određivanje izražaja Cx45 i Panx1.

Šećerna bolest tipa 1 dovela je do značajnoga smanjenja izražaja Cx40 i Cx43, dok je izražaj Panx1 bio značajno povećan ($P < 0,05$ – $P < 0,01$). Prehrana s različitim omjerom n-6 i n-3 PUFA-ama značajno je utjecala na promjenu izražaja Cx i Panx1. Visoki omjer n-6 i n-3 PUFA-i u prehrani uzrokovao je smanjenje izražaja Cx45 i Panx1 ($P < 0,05$ – $P < 0,01$). Prehrana s niskim n-6 i n-3 omjerom dovela je do povećanja izražaja Cx43 u dijabetičnih štakora ($P < 0,01$ – $P < 0,001$). Prehrana s visokim udjelom masti i šećera nije dovela do promjene izražaja Cx45 u bubrežima štakora, dok je izražaj Panx1 bio značajno povećan u tubularnim stanicama mužjaka hranjenih HFHSD-om ($P < 0,05$). Liraglutid je uz HFHSD u ženki doveo do povećanja glomerularne ekspresije Panx1 ($P < 0,05$ – $P < 0,01$), odnosno tubularne ekspresije Panx1 u mužjaka štakora ($P < 0,05$). U štakora oba spola liraglutid je uz HFHSD uzrokovao povećanje izražaja Cx45 ($P < 0,05$). Terapija metforminom uz HFHSD u štakora oba spola dovela je do povećanja tubularnoga izražaja Panx1 ($P < 0,01$ za ženke i $P < 0,01$ – $P < 0,05$ za mužjake) dok je izražaj Cx45 bio povećan samo u mužjaka ($P < 0,05$). Prehrana s

visokim udjelom masti i šećera uzrokovala je zadebljavanje Bowmanove čahure (BC) koju terapija metforminom ili liraglutidom nije uspjela ublažiti. Učinci terapije na zadebljavanje BC-a, stupanj tubulointersticijske fibroze i izražaja Cx45 i Panx1 bili su ovisni o spolu, dok je do povećanja broja mitohondrija u proksimalnim kanalićima došlo u oba slučaja neovisno o spolu.

Hiperglikemijom oštećena komunikacija na staničnoj razini može se poboljšati prehranom u kojoj su zastupljene PUFA-e što ukazuje na njihov povoljan učinak i moguću dodatnu terapijsku mogućnost u liječenju DM-a. Učinci metformina i liraglutida na bubrezima štakora hranjenih HFHSD-om uglavnom su ovisni o spolu te nisu nužno blagotvorni. Budući da oba lijeka dovode do promjena u izražaju Cx45 i Panx1, njihovo se djelovanje može povezati s utjecajem na razini međustanične komunikacije.

10. SUMMARY

Metabolic disorders such as obesity, diabetes mellitus (DM) and metabolic syndrome (MS) impair intercellular communication in various organs and tissues, including the kidneys. Because connexins and pannexins are essential proteins for cell-to-cell communication, their expression may be altered. Dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids (PUFA) may be beneficial for patients with diabetic nephropathy (DN). Metformin and liraglutide, commonly prescribed drugs for DM and MS, also have a protective effect on renal function. Presumably, their effect at the cellular level could be reflected in altered expression of connexins and pannexins.

In the DM1 model study, male rats were divided into four groups based on the ratio of n-6 and n-3 in the diet. Rats in the control group (C) and diabetic group (STZ) had a ratio of 7, in the STZ + N6 group of 60, and in the group (STZ + N3) that received 16 % EPA and 19 % DHA, the ratio was 1. Immunohistochemistry was used to determine the expression of Cx40, Cx43, Cx45 and Panx1 in the renal cortex. In the other study of the MS model, rats of both sexes were divided into four groups: standard diet, high fat and high sugar diet (HFHSD), HFHSD with metformin therapy and HFHSD with liraglutide therapy. The treatment lasted 14 weeks. Histological methods were used to assess the pathological changes in the kidneys, and immunohistochemistry was used to determine the expression of Cx45 and Panx1.

DM1 caused a significant decrease in Cx40 and Cx43 expression, whereas Panx1 expression was significantly increased ($p < 0,05$ – $p < 0,01$). Different ratios of dietary n-6/n-3-PUFA significantly altered connexin and Panx1 expression. A high n-6/n-3-PUFA ratio decreased the expression of Cx45 and Panx1 ($p < 0,05$ – $p < 0,01$). A low n-6/n-3 PUFA ratio increased Cx43 expression in diabetic rats ($p < 0,01$ – $p < 0,001$). HFHSD did not alter Cx45 expression, whereas Panx1 expression was significantly increased in male rat tubule cells under HFHSD ($p < 0,05$). Liraglutide and HFHSD in female rats increased glomerular expression of Panx1 and tubular expression of Panx1 in male rats. In rats of both sexes, liraglutide and HFHSD caused an increase in Cx45 expression. Metformin and HFHSD increased tubular expression of Panx1 in rats of both sexes, whereas Cx45 expression was increased only in male rats. HFHSD caused Bowman's capsule (BC) thickening in both sexes. The effects of therapy on BC thickening, the extent of tubulointerstitial fibrosis and the expression of Cx45 and Panx1 were sex-dependent, whereas the increase in mitochondrial number in proximal tubules was independent of therapy.

At DM, impaired intercellular communication can be improved by dietary supplementation with PUFAs, indicating their beneficial effects and a possible option for the treatment of DM. The effects of metformin and liraglutide in the kidneys of HFHSD rats are largely sex-dependent and not necessarily beneficial. Because both drugs alter the expression of Cx45 and Panx1, their effects could impact on the cell-cell communication.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Luetić

Adresa: Starčevićeva 13, Split

Mobitel: 091 165 65 25

E-pošta: mluetić@mefst.hr

Datum rođenja: 12. 4. 1990.

Državljanstvo: hrvatsko

Obrazovanje

- | | |
|---------------|--|
| 2017. – danas | Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet
Poslijediplomski studij „Biologija novotvorina“ |
| 2009. – 2015. | Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij „Medicina“ |
| 2005. – 2009. | V. gimnazija „Vladimir Nazor“, Split |

Radno iskustvo

- | | |
|---------------|--|
| 2018. – danas | Specijalizantica patologije i citologije
Klinički bolnički centar Split |
| 2016. – 2018. | Doktorica medicine
Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije |
| 2015. – 2016. | Doktorica medicine, pripravnica
Klinički bolnički centar Split |

Nastavne aktivnosti

2018. – danas Vanjski suradnik na Katedri za patologiju, Medicinski fakultet, Split

Profesionalno usavršavanje

- One Roche Oncology, Split, 3.2019.
- MEDIP, Tuheljske toplice, 3.2019.
- 10th Arkadi M. Rywlin International Pathology Slide Seminar Symposium in Anatomic Pathology, Split, 5.2018.

Članstva u stručnim udruženjima

- Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu
- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatski liječnički zbor

Strani jezici

engleski jezik – govor, razumijevanje – C2*, pisanje – C1*

talijanski jezik – govor, razumijevanje i pisanje – B2*

njemački jezik – govor, razumijevanje – A1*, pisanje – A2*

* Zajednički europski referentni okvir za jezike

Priznanja i nagrade

- Pohvalnica dekana za izvrsne rezultate postignute tijekom studija
- Rektorova nagrada za akademsku godinu 2012./2013. za izvanredne rezultate postignute tijekom studija
- Dekanova nagrada za akademsku godinu 2011./2012. za izvanredne rezultate postignute tijekom studija
- Nagrada Splitsko-dalmatinske županije za prosjek ocjena 5,0 u akademskoj godini 2011./2012.
- Stipendija Sveučilišta u Splitu i Nacionalne zaklade za potporu učeničkom i studentskom standardu tijekom cijelog studija

Publikacije

1. **Luetić M**, Kretzschmar G, Grobe M, Jerčić L, Bota I, Ivić V, i sur. Sex-specific effects of metformin and liraglutide on renal pathology and expression of connexin 45 and pannexin 1 following long-term high-fat high-sugar diet. *Acta Histochem.* 2021;123(8):151817.
2. **Luetić M**, Uljević MV, Mašek T, Benzon B, Vukojević K, Filipović N. PUFAs supplementation affects the renal expression of pannexin 1 and connexins in diabetic kidney of rats. *Histochem Cell Biol.* 2020;153(3):165–75.
3. **Milat M**, Mulić R. Epidemiološke karakteristike tetanusa u Hrvatskoj. *Liječ Vjesn.* 2016;138(7–8):188–94.