

# Izražaj koneksina 37, 40, 43 i 45 i paneksina 1 u bubrezima miševa s isključenim St8sia1 genom

---

**Meter, Diana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:781699>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Diana Meter, dr. med.**

**IZRAŽAJ KONEKSINA 37, 40, 43 I 45 I PANEKSINA 1 U BUBREZIMA  
MIŠEVA S ISKLJUČENIM ST8SIA1 GENOM**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Diana Meter, dr. med.**

**IZRAŽAJ KONEKSINA 37, 40, 43 I 45 I PANEKSINA 1 U BUBREZIMA**  
**MIŠEVA S ISKLJUČENIM ST8SIA1 GENOM**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2023.**

Doktorska disertacija izrađena je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta “Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ Hrvatske zaklade za znanost (broj projekta IP - 2014-09-2324), voditeljice prof. dr. sc. Marije Heffer. Animalni eksperimenti su provedeni u nastambi za laboratorijske životinje Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku. Obrada i analiza uzoraka tkiva je provedena u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Rad je izrađen u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu (voditeljica izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović), gdje je pristupnica sudjelovala u planiranju i organizaciji istraživanja, a potom u prikupljanju, obradi, pripremi i analizi prikupljenih tkiva, postupcima imunohistokemijskog bojanja, mikroskopiranju i fotografiranju, analizi mikrofotografija, obradi dobivenih podataka, tumačenju rezultata te pisanju iz rezultata proizašlog rada.

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

**Objavljeni znanstveni rad na kojem se temelji doktorska disertacija:**

**Meter D**, Racetin A, Vukojević K, Balog M, Ivić V, Zjalić M, et al. A Lack of GD3 Synthase Leads to Impaired Renal Expression of Connexins and Pannexin1 in St8sia1 Knockout Mice.

Int. J. Mol. Sci. 2022; 23(11):6237. <https://doi.org/10.3390/ijms23116237>

(Čimbenik odjeka za 2021. godinu: 6,628)

*Hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović, na bezrezervnoj podršci. Hvala Vam na susretljivosti, prijateljstvu, beskrajnom strpljenju, pomoći i stručnom vodstvu tijekom stvaranja ove doktorske disertacije. Uzor ste znanstvene čestitosti i primjer iznimne ljudske topline, neizmjereno sam sretna što sam imala priliku raditi s Vama i učiti od Vas.*

*Zahvalna sam kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na pomoći prilikom izrade doktorske disertacije, a posebno dragoj prof. dr. sc. Katarini Vukojević na potpori i prijateljstvu tijekom cijelog akademskog obrazovanja.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, sestrama i bratu, koji su nesebičnom potporom i bezuvjetnom ljubavlju proželi i učvrstili temelje svega što jesam te osnažili svaki korak na mome putu.*

*Hvala mom suprugu Miji na beskrajnoj ljubavi i podršci, poticaju na napredovanje i vjeri u moj uspjeh. Najveće hvala mom sinu Josipu, koji mi je svojim rođenjem pokazao što je najvrjednije u životu. Hvala sine što si bio strpljiv dok sam radila na doktorskoj disertaciji.*

*Hvala svim divnim ljudima koji su me pratili, podučavali i bodrili tijekom akademskog obrazovanja te kolegama iz Osijeka, prof. Mariji Heffer, Marti Balog, Vedrani Ivić i Miloradu Zjaliću. I konačno, hvala na potpori svim mojim dragim prijateljima i kolegama sa Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju.*

## SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA.....	1
1. UVOD.....	4
1.1. Bubrež.....	5
1.1.1. Anatomija bubrega .....	5
1.1.2. Građa i funkcija nefrona .....	6
1.1.3. Funkcija bubrega .....	9
1.1.4. Usporedba bubrega miša i čovjeka.....	11
1.2. Koneksini .....	12
1.2.1. Izražaj koneksina u bubrezima.....	15
1.3. Paneksini .....	16
1.3.1. Izražaj paneksina u bubrezima.....	17
1.4. Gangliozidi .....	18
1.5. Miševi s isključenim genom <i>Stδsial</i> .....	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	23
3. HIPOTEZA.....	25
4. MATERIJALI I METODE.....	27
4.1. Eksperimentalne životinje .....	28
4.2. Postupci.....	28
4.2.1. Uzimanje uzoraka i priprema bubrežnog tkiva za imunohistokemiju.....	28
4.2.2. Imunohistokemija.....	28
4.2.3. Prikupljanje i analiza podataka .....	31
4.3. Statistička analiza .....	31
5. REZULTATI.....	32
5.1. Izražaj koneksina 37 u bubrezima miševa divljeg tipa i <i>Stδsial</i> -KO miševa .....	33
5.2. Izražaj koneksina 40 u bubrezima miševa divljeg tipa i <i>Stδsial</i> -KO miševa .....	38
5.3. Izražaj koneksina 43 u bubrezima miševa divljeg tipa i <i>Stδsial</i> -KO miševa .....	40

5.4.	Izražaj koneksina 45 u bubrezima miševa divljeg tipa i <i>St8sial</i> -KO miševa .....	42
5.5.	Izražaj paneksina 1 u bubrezima miševa divljeg tipa i <i>St8sial</i> -KO miševa. ....	45
6.	RASPRAVA .....	48
6.1.	Značenje rezultata istraživanja na animalnom modelu za humanu dijabetičku nefropatiju i hipertenziju.....	54
7.	ZAKLJUČCI.....	57
8.	SAŽETAK .....	59
9.	SUMMARY .....	61
10.	LITERATURA .....	63
11.	ŽIVOTOPIS .....	78



## POPIS OZNAKA I KRATICA

$\alpha$ SMA	alfa aktin glatkih mišićnih stanica (eng. <i>alpha smooth muscle actin</i> )
ADH	antidiuretski hormon
AGE	napredni završni produkti glikacije (eng. <i>Advanced Glycation End products</i> )
ANOVA	analiza varijance (eng. <i>analysis of variance</i> )
AQP1	akvaporin 1 (eng. <i>aquaporine 1</i> )
AQP2	akvaporin 2 (eng. <i>aquaporine 2</i> )
ATP	adenozin trifosfat (eng. <i>adenosine triphosphate</i> )
Ca <sup>2+</sup>	ion kalcija
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (eng. <i>cyclic adenosine-monophosphate</i> )
c-Met	receptor faktora rasta hepatocita (eng. <i>hepatocyte growth factor receptor</i> )
COC	kumulus-oocita kompleks (eng. <i>cumulus-oocyte complex</i> )
COOH-kraj	karboksi kraj
Cl <sup>-</sup>	ion klora
CTX.	kora (eng. <i>cortex</i> )
Cx	koneksin (eng. <i>connexin</i> )
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (eng. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> aglutinin
DCT	distalni zavijeni kanalić (eng. <i>distal convoluted tubule</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTC	stanice distalnih tubula (eng. <i>distal tubular cells</i> )
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ER	endoplazmatski retikulum
GBM	glomerularna bazalna membrana
GJ	tijesni spoj (eng. <i>gap junction</i> )
GJA	alfa protein tijesnih spojeva (eng. <i>gap junction alpha protein</i> )

GlcCer	glukozilceramid
GSL	glikosfingolipid
HIV-1	virus humane imunodeficijencije-1 (eng. <i>Human Immunodeficiency Virus-1</i> )
I.D.	integrirana gustoća (eng. <i>integrated density</i> )
IFN- $\gamma$	interferon gama
IGF1R	receptor faktora rasta nalik inzulinu 1 (eng. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> )
IN.MED.	unutarnja medula (eng. <i>inner medulla</i> )
IN.S.	unutarnji sloj vanjske medule (eng. <i>inner stripe</i> )
InsR	inzulinski receptor (eng. <i>insulin receptor</i> )
IP <sub>3</sub>	inozitol trifosfat (eng. <i>inositol triphosphate</i> )
JGA	jukstaglomerularni aparat
K <sup>+</sup>	ion kalija
KO	isključenje gena (eng. <i>knock out</i> )
LacCer	laktozilceramid
LTL	<i>Lotus Tetragonolobus</i> lektin
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (eng. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
Na <sup>+</sup>	ion natrija
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid (eng. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NH <sub>2</sub> -kraj	amino kraj
O.S.	vanjski sloj vanjske medule (eng. <i>outer stripe</i> )
Panx	paneksin (eng. <i>pannexin</i> )
PBS	otopina fosfatnog pufera (eng. <i>phosphate buffer saline</i> )
PCT	proksimalni zavijeni kanalić (eng. <i>proximal convoluted tubule</i> )
PDGFR	receptor faktora rasta porijeklom iz trombocita (eng. <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i> )
PTC	stanice proksimalnih tubula (eng. <i>proximal tubular cells</i> )
RFU	relativne jedinice za intenzitet fluorescencije (eng. <i>relative fluorescence units</i> )

RNA	ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (eng. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> )
tsm	biljeg tubularnog segmenta (eng. <i>tubular segment marker</i> )
UUO	jednostrana opstrukcija uretera (eng. <i>unilateral ureteral obstruction</i> )
VEGFR	receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> )
WT	divlji tip (eng. <i>wild type</i> )

## **1. UVOD**

## 1.1. Bubrezi

### 1.1.1. Anatomija bubrega

Bubrezi su parni organi, kod ljudi smješteni retroperitonealno uz stražnju trbušnu stijenu s obje strane kralježnice. Položeni su između transverzalnih nastavaka 12. prsnog kralješka proksimalno i 3. slabinskog kralješka distalno. Izgledom podsjećaju na zrno graha, imaju prednju konveksnu i stražnju plosnatu površinu, medijalni konkavni i lateralni konveksni rub te gornji i donji pol. Gornji pol bubrega je okruglast, deblji je od donjeg pola te je u odnosu na njega položen bliže središnjoj liniji (1). Oba gornja pola su obično usmjerena blago medijalno i posteriorno u odnosu na donje polove (2). Medijalni rubovi oba bubrega su rotirani prema naprijed, zbog čega su lateralni rubovi smješteni posteriorno (3). Zbog veličine jetre u desnom hipohondriju desni bubreg je niže položen od lijevog. Lijevi bubreg je položen medijalnije te je nešto duži i uži od desnog (1).

Gornji polovi oba bubrega sprijeda su prekriveni nadbubrežnim žlijezdama. Desnom bubregu sprijeda se nalazi desni zavoje debelog crijeva i jetra, a medijalno mu se nalazi dvanaesnik i donja šuplja vena. Lijevi bubreg se nalazi iza lijevog zavoja debelog crijeva, njegov hilus je lateralno od repa gušterače, gornji medijalni dio je uz veliku krivinu želuca, a gornji pol se nalazi uz slezenu (4-6). Straga ošit prekriva gornju trećinu oba bubrega. Preko gornjeg pola desnog bubrega prolazi 12. rebro, a preko gornjeg pola lijevog bubrega prolaze 11. i 12. rebro. Bubrezi obično leže na medijalnom dijelu slabinskog mišića (lat. *m. psoas major*) i lateralnom dijelu četvrtastog slabinskog mišića (lat. *m. quadratus lumborum*) (4).

Težina bubrega varira od 150 do 200 grama kod muškaraca i od 120 do 135 grama kod žena. Dužina bubrega je između 10 i 12 cm, širina od 5 do 7 cm i debljina od 3 do 5 cm (2). Bubrežni parenhim obavijen je čvrstom fibroznom čahuricom. Oba bubrega u svojim čahurama okružuje sloj perirenalnog masnog tkiva, u koji je osim bubrega uklopljena i nadbubrežna žlijezda. Bubrežna ovojnica (lat. *fascia renalis*) obavija masno tkivo oko bubrega i nadbubrežne žlijezde. Bubregu se sprijeda nalazi peritoneum, a straga se između bubrežne i slabinske ovojnice nalazi pararenalno masno tkivo (7).

Na medijalnom rubu svakog bubrega se nalazi bubrežni hilus, mjesto na kojem u bubreg ulaze i iz njega izlaze krvne i limfne žile i živci. U bubrežnom hilusu se ispred bubrežne arterije nalazi bubrežna vena, a iza bubrežne arterije se nalazi bubrežna nakapnica, koja u hilusu izlazi iz bubrega i dalje se nastavlja u mokraćovod (8). Arterijska opskrba svakog bubrega potječe iz bubrežne arterije. Ona se prije ulaska u hilus dijeli na prednji i stražnji ogranak, koji se u hilusu granaju u segmentalne, a ove u interlobarne arterije. Interlobarne arterije prolaze između bubrežnih piramida, a na granici između kore i srži se granaju u *arteriae arcuatae*. Od njih pod pravim kutem prema bubrežnoj čahuri

polaze lobularne arterije, iz kojih nastaju dovodne arteriole koje dovode krv u kapilare glomerula (9). U glomerularnoj kapilarnoj mreži se krv ultrafiltrira i ultrafiltrat prelazi u mokraćni prostor prije prolaska kroz tubularni sustav. Djelomično filtrirana krv napušta glomerul kroz odvodnu arteriolu koja grananjem tvori peritubularnu kapilarnu mrežu te osigurava opskrbu tubularnog sustava oksigeniranom krvlju (10, 11). Ova kapilarna mreža je odgovorna i za povratak reapsorbirane slobodne vode, iona i drugih sastojaka plazme poput aminokiselina i glukoze u cirkulaciju (10). Odvodne arteriole iz jukstamedularnih nefrona tvore ravne žile (lat. *vasa recta*), koje iz kore odlaze ravno u srž, oblikuju petlju i vraćaju se na granicu kore i srži, a odgovorne su za opskrbu srži kisikom i hranjivim tvarima. Kapilare vanjskog dijela kore bubrega i čahure čine zvjezdolike vene (lat. *venae stellatae*), koje potom prelaze u interlobularne vene. Prateći tok arterija, interlobularne vene odvođe krv u *venae arcuatae*, potom u interlobarne vene i konačno u bubrežnu venu koja u hilusu izlazi iz bubrega (9). Limfne žile bubrega dreniraju se u limfne čvorove u hilusu i slabinske limfne čvorove. U inervaciji bubrega sudjeluju aferentna i eferentna vlakna bubrežnog plexusa, pri čemu je aferentna inervacija važna u prepoznavanju nociceptivnih podražaja, dok je eferentna inervacija primarno simpatička (7, 12).

Na frontalnom presjeku bubrega makroskopski se razlikuju kora i srž. Oba dijela sadrže različite dijelove nefrona, koji je funkcionalna jedinica bubrega. Kora se nalazi s vanjske strane ispod vezivne čahure i granularnog je izgleda, a čine je glomeruli, zavijeni, ravni i sabirni kanalići. Srž bubrega se nalazi s unutarnje strane te je ispruganog izgleda zbog ravnih i sabirnih kanalića od kojih se sastoji. Sabirni kanalići u srži formiraju konične strukture, bubrežne piramide, koje međusobno razdvajaju izdanci kore (Bertinijeve kolumne) (13). Bubrežna piramida s pripadajućim dijelom kore koja je okružuje čini bubrežni rezanj (8). Svaki bubreg sadrži 5-11 piramida, čije baze su usmjerene prema kori, a vrhovi (papile) su usmjereni prema bubrežnom sinus. Papile su perforirane otvorima sabirnih kanalića kojima se urin usmjerava u male vrčeve (7). Bubreg sadrži 4-12 malih vrčeva, koji se stapaju u 2-3 velika vrča. Veliki vrčevi se nastavljaju u bubrežni sinus koji služi kao početni rezervoar mokraće, odakle mokraća prolazi u bubrežnu nakapnicu i dalje u mokraćovod (7, 8).

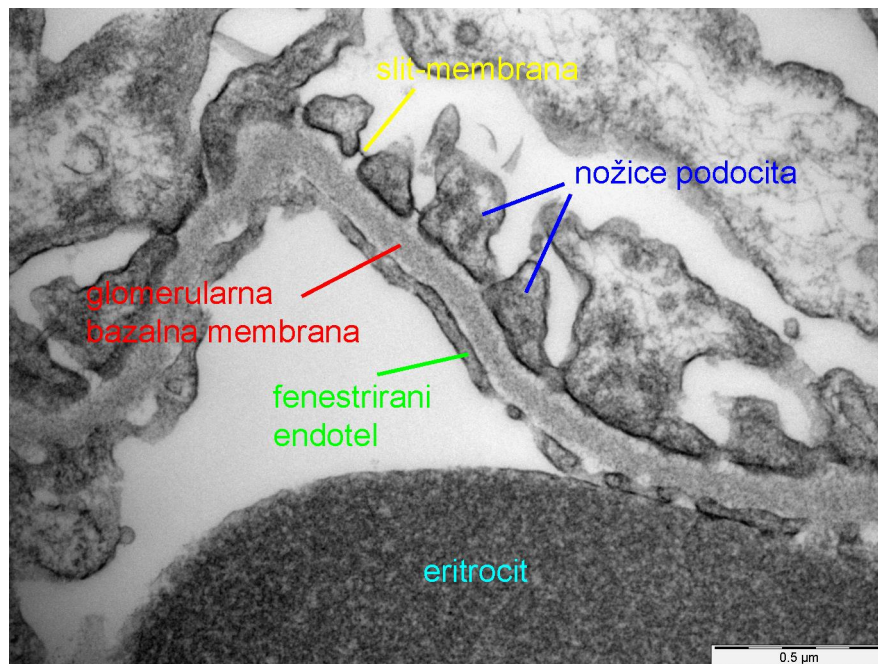
### **1.1.2. Građa i funkcija nefrona**

Nefron je strukturna i funkcionalna jedinica bubrega. Svaki bubreg kod čovjeka sadrži oko milijun nefrona. Dijelovi nefrona su bubrežno tjelešće koje čine glomerul i Bowmanova čahura, proksimalni zavijeni kanalić (PCT), silazni i uzlazni krak Henleove petlje, distalni zavijeni kanalić (DCT), sabirne cjevčice i cijevi (14). Glomerul filtrira velike količine krvi, koju tubularni sustav pretvara u urin reapsorpcijom i izlučivanjem slobodne vode i otopljenih tvari (15).

Prema položaju unutar kore razlikuju se kortikalni nefroni s glomerulima smještenim blizu kortikalne površine i kratkim Henleovim petljama te jukstamedularni nefroni čiji glomeruli su smješteni blizu kortikomedularne granice, a Henleove petlje su im duge i prodiru duboko u srž bubrega (14). Kod čovjeka su najzastupljeniji kortikalni nefroni koji čine 85% svih nefrona, a preostalih 15% su jukstamedularni nefroni (15).

Bubrežno tjelešće (glomerul) je klupko kapilara, promjera 200  $\mu\text{m}$ , okruženo dvoslojnom epitelnom Bowmanovom čahuricom. Bowmanovu čahuru čine unutarnji visceralni list koji obavija kapilare glomerula i vanjski parijetalni list, između kojih se nalazi interkapsularni (mokraćni) prostor u koji se filtrira glomerularni filtrat (10). Svako bubrežno tjelešće ima vaskularni i mokraćni pol. Na vaskularnom polu ulazi dovodna i izlazi odvodna arteriola, a na mokraćnom polu mokraćni prostor Bowmanove čahure prelazi u PCT (9). Parijetalni list Bowmanove čahure čini jednoslojni pločasti epitel, osim u blizini mokraćnog pola, gdje epitelne stanice postaju kuboidnije i nalikuju epitelnim stanicama PCT (11). Nasuprot tome, epitelne stanice visceralnog lista Bowmanove čahure koje oblažu glomerularno kapilarno klupko su veće, visoko specijalizirane stanice neobične strukture, a nazivaju se podociti (11). Ove su stanice građene od trupa koji ima nekoliko primarnih izdanaka, a od svakog od njih polaze brojni sekundarni izdanci (nožice). Sekundarni izdanci susjednih podocita se međusobno isprepliću i dodiruju bazalnu membranu glomerularnih kapilara na pravilnoj udaljenosti tvoreći tako filtracijske pukotine široke oko 25 nm (slit membrana) (9). Endotel glomerularnih kapilara je fenestriran, s otvorima promjera između 70 nm i 100 nm (16). Stapanjem podocita i bazalnih lamina kapilare nastaje glomerularna bazalna membrana (GBM). To je oko 0,1  $\mu\text{m}$  debela filtracijska barijera koja razdvaja krv u kapilarama od mokraćnog prostora (9). GBM ima selektivna svojstva potrebna za stvaranje primarnog glomerularnog filtrata (10, 16). Elektronskim mikroskopom jasno se mogu razlikovati tri sloja GBM, središnji gusti sloj (lat. *lamina densa*), sastavljen od kolagena tipa IV i laminina te unutarnji i vanjski svijetli sloj (lat. *lamina rara interna* i *lamina rara externa*) koji sadrže fibronektin (9) (Slika 1).

Uz stijenke endotelnih stanica kapilara i podocita u glomerulu se nalaze intraglomerularne mezangijske stanice koje imaju višestruke funkcije. Strukturna su potpora glomerula, sintetiziraju međustaničnu tvar, vrše endocitozu i imaju sposobnost kontrakcije, a osim toga posreduju mehanizme koji utječu na glomerularni protok (17). Sadržavaju receptore za angiotenzin II, čija aktivacija dovodi do smanjenja glomerularnog protoka. Također sadržavaju receptore za atrijski natriuretski čimbenik, čija aktivacija dovodi do povećanja protoka krvi (17). Na žilnom polu izvan glomerula se nalaze ekstraglomerularne mezangijske stanice, a dio su jukstaglomerularnog aparata (JGA) koji sudjeluje u održavanju krvnog tlaka (17).



**Slika 1.** Glomerularna filtracijska membrana bubrega štakora slikana transmisijskim elektronskim mikroskopom. Ljubaznošću izv. prof. dr. sc. Natalije Filipović i prof. dr. sc. Ivane Bočine.

Na mokraćnom polu bubrežnog tjelešca započinje tubularni sustav nefrona. Tu se pločasti epitel parijetalnog lista Bowmanove čahure nastavlja u kubični ili niski cilindrični epitel PCT. Stanice ovog kubičnog epitela su velike i sadrže brojne mitohondrije koji oblažu bazalni dio stanice. Na slobodnoj plohi stanice se nalazi četkasta prevlaka koju čini mnoštvo mikrovila dužine oko 1 μm, a služe za povećanje površine u kontaktu s glomerularnim ultrafiltratom (10). Među polazištima mikrovila nalaze se pinocitotski mjehurići, povezani sa sposobnošću stanice da apsorbira makromolekule. Na bazolateralnim dijelovima epitelnih stanica PCT smještene su natrijeve pumpe koje služe za aktivni prijenos iona natrija (17). Na PCT se nastavlja Henleova petlja koja se sastoji od debelog i tankog dijela silaznog kraka, te tankog i debelog dijela uzlaznog kraka. Oblika je slova U, a stijenku joj čine pločaste epitelne stanice kojima je dio s jezgrom izbočen u lumen. U svom silaznom toku tubul postaje užji, a stanice manje, s nekoliko mitohondrija i kratkim mikrovilima. Tubul zatim skreće gore prema kori, prelazi u debeli uzlazni krak koji oblažu veće stanice s brojnijim mikrovilima i mitohondrijima kako bi se uključile u aktivni transport natrija za razrjeđivanje urina (10). Na debeli uzlazni krak Henleove petlje nastavlja se DCT, koji je obložen jednoslojnim kubičnim epitelom. Ove epitelne stanice sadrže najveći broj mitohondrija među svim stanicama u nefronu (14). Nemaju četkastu prevlaku ni apikalne pinocitotske mjehuriće što ih razlikuje od epitelnih stanica PCT. Sudjeluju u prijenosu iona. DCT u kori bubrega priliježe uz žilni pol bubrežnog tjelešca nefrona iz



kojeg je potekao (17). Dodirno mjesto se nalazi u jukstaglomerularnom području, koje je zaduženo za regulaciju glomerularne filtracije putem tubuloglomerularne povratne sprege (18). Na ovom mjestu se stijenka DCT mijenja, stanice postaju cilindrične sa zbijenim jezgrama, što se pod mikroskopom doima tamnije, pa se taj izmijenjeni dio zove *macula densa* (10). U jukstaglomerularnom području stijenka dovodne arteriole sadrži jukstaglomerularne stanice sa sekretnim zrcima u citoplazmi koje izlučuju enzim renin (9). *Macula densa* DCT i jukstaglomerularne stanice dovodne arteriole funkcionalno i strukturno povezuju ekstraglomerularne mezangijske stanice te zajedno čine JGA (19). Na DCT se dalje nastavljaju kortikalne sabirne cjevčice, obložene kubičnim epitelom, a na putu kroz bubrežnu srž stanice sabirnih cjevčica postaju cilindrične. Sabirne cjevčice se dalje udružuju u sabirne cijevi. Stanice koje čine ove cjevčice i cijevi dijele se na glavne i umetnute (interkalirane). Pojava glavnih stanica označava prijelaz u sabirne tubule i kraj nefrona (14). Epitel sabirnih cijevi je pod utjecajem antidiuretskog hormona (ADH), koji djeluje na propusnost ovog dijela za vodu i tako doprinosi zadržavanju vode u tijelu (17).

U prostoru između krvnih i limfnih žila te mokraćnih kanalića nalazi se bubrežni intersticij čiji volumen zauzima mali dio kore, a povećava se u srži. Intersticij je građen od vezivnog tkiva s fibroblastima, kolagenih vlakana i proteoglikana. Žljezdane stanice u intersticiju srži zovu se intersticijske stanice, a sudjeluju u sintezi prostaglandina i prostaciklina (9).

### **1.1.3. Funkcija bubrega**

Bubrezi obavljaju nekoliko funkcija važnih za održavanje homeostaze organizma, uključujući izlučivanje otpadnih tvari poput amonijaka i ureje, regulaciju elektrolita i acidobazne ravnoteže. Imaju vitalnu ulogu u kontroli krvnog tlaka i održavanju unutaržilnog volumena putem sustava renin-angiotenzin-aldosteron. Odgovorni su za reapsorpciju aminokiselina, elektrolita, kalcija, fosfata, vode i glukoze, kao i za lučenje hormona kalcitriola i eritropoetina (13, 20, 21).

Protok krvi kroz oba bubrega kod odraslog čovjeka je 1,2-1,3 L u minuti, iz čega proizlazi da sva krv koja se nalazi u tijelu svako 4-5 minuta prođe kroz bubrege (9). U glomerulu se ta krv filtrira pri čemu nastaje 120 ml glomerularnog filtrata u minuti, odnosno 160 do 180 L dnevno (16). Glomerularni filtrat (primarna mokraća) nastaje kao rezultat razlike između hidrostatskog tlaka krvi te onkotskog tlaka plazme i hidrostatskog tlaka Bowmanove čahure (9). Krv se filtrira kroz slojeve endotela, bazalne membrane i podocita, te se pritom vrši selekcija po naboju i veličini molekula. Po kemijskom sastavu glomerularni filtrat je sličan sastavu plazme, gotovo uopće ne sadrži bjelančevine, jer kroz glomerularni filter ne prolaze makromolekule veće od 70 kDa (9). Najveći dio primarne

mokraće se prolaskom kroz kanalni sustav nefrona reapsorbira te se dnevno proizvede i u bubrežnu nakapnicu izluči ukupno oko 2 L sekundarne mokraće (22).

Iz mokraćnog prostora Bowmanove čahure primarna mokraća ulazi u PCT. To je mjesto gdje se reapsorbira 60-70% slobodne vode i natrijevog klorida, većina kalija, fosfata i  $\text{HCO}_3$  te gotovo sve hranjive tvari poput glukoze i aminokiselina (22). Apsorpcija glukoze, aminokiselina i natrija odvija se aktivnim prijenosom pomoću natrijeve pumpe. Voda se apsorbira pasivno difuzijom u smjeru osmotskog gradijenta (17). Na ovom segmentu nefrona se osim apsorpcije odvija i aktivna sekrecija otopljenih tvari, konverzija 25-hidroksi-vitamina D u 1,25-dihidroksi-vitamin D, kao i bubrežna glukoneogeneza (22).

Prolaskom glomerularnog filtrata dalje kroz Henleovu petlju dolazi do reapsorpcije 30 do 40% natrija uz važne promjene u osmolarnosti urina (23). Tanki dio silaznog kraka Henleove petlje je propustan za vodu i male otopljene tvari, dok su oba dijela uzlaznog kraka nepropusni za vodu, ali su propusni za otopljene tvari (9). U debelom dijelu uzlaznog kraka nalazi se  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$  kotransporter kojim se ove otopljene tvari aktivno apsorbiraju iz tubularne tekućine u intersticij, povećavajući njegovu osmolarnost. To dovodi do protoka slobodne vode iz tankog dijela silaznog kraka u bubrežni intersticij. Prolazeći kroz tanki silazni dio Henleove petlje mokraća postaje hipertonična, dok prolaskom kroz debeli dio uzlaznog kraka postaje hipotonična. Reapsorbirana voda se vraća u cirkulaciju duž *vasa recta* (24).

Dalje na svom putu glomerularni filtrat dolazi do DCT koji je odgovoran za fino podešavanje sastava mokraće. Sudjeluje u apsorpciji 5 do 10% filtriranog natrija i klorida, kao i u izlučivanju kalija. Kao i uzlazni krak Henleove petlje, DCT je nepropustan za vodu te tako dodatno razrjeđuje urin (25). Na ovom dijelu nefrona najizraženija je aktivnost  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ -aze koja doprinosi reapsorpciji natrija (14). DCT je jedini dio nefrona u kojem je izražen  $\text{Na-Cl}$  kotransporter koji posreduje u većini reapsorpcije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  (26). Stanice *macule dense* DCT su osjetljive na ionski sadržaj i volumen vode u tekućini kanalića te kao odgovor na primljene signale pospješuju oslobađanje enzima renina u krvotok (10). Enzim renin izlučuju jukstaglomerularne stanice. To su promijenjene glatke mišićne stanice *tunicae mediae* dovodne arteriole. On djeluje na angiotenzinogen pri čemu nastaje angiotenzin I, koji se djelovanjem pretvorbenog enzima aktivira i nastaje angiotenzin II. Angiotenzin II djeluje na povišenje krvnog tlaka sužavanjem arteriola i stimuliranjem izlučivanja hormona aldosterona iz kore nadbubrežne žlijezde (17). Aldosteron svojim djelovanjem na stanice DCT-a potiče reapsorpciju natrija i vode te izlučivanje kalija, pa tako regulira ukupnu količinu soli i vode u tijelu (25).

Sabirne cijevi imaju glavnu ulogu u koncentriranju mokraće. Pod utjecajem su ADH koji izlučuje hipofiza. Ograničeni unos vode dovodi do lučenja ADH, koji povećava propusnost epitelnih

stanica sabirnih cijevi za vodu. Voda se tako apsorbira i zadržava u tijelu (9). Na ovom dijelu nefrona se odvija i izlučivanje vodika i amonijevih iona kroz interkalirane (umetnute) stanice, što je važno za održavanje acidobazne ravnoteže u krvi (27).

#### **1.1.4. Usporedba bubrega miša i čovjeka**

Prilikom interpretacije rezultata istraživanja provedenih na pokusnim laboratorijskim životinjama potrebno je uzeti u obzir razlike u makroskopskoj i mikroskopskoj anatomiji te funkciji bubrega u odnosu na ljude. Postoje neke razlike u fiziologiji i morfologiji bubrega između miševa i ljudi koje je važno naglasiti (28).

Bubrezi miša su kao i kod čovjeka parni organi, smješteni retroperitonealno. Okruženi su bijelim masnim tkivom s umetnutim džepovima smeđeg masnog tkiva. Oba bubrega se nalaze u gornjem srednjem abdomenu. Desni bubreg je smješten kranijalnije uz desni režanj jetre, dok je lijevi više kaudalno (29). Nadbubrežne žlijezde miša su kao i kod čovjeka usko povezane s kranijalnim polom bubrega. Muški miševi imaju relativno veće bubrege nego ženke, a težina bubrega varira među sojevima (29). Parenhim mišjeg bubrega se dijeli na koru, vanjsku srž, koja ima vanjski i unutarnji dio te unutarnju srž koju čini bubrežna papila. Bubreg miša je za razliku od čovjeka unilobaran (unipiramidalan) sa samo jednom papilom koja se proteže duboko u bubrežnu nakapnicu (28). Prokrvljenost i inervacija bubrega slična je u obje vrste (29).

Osnovna funkcionalna jedinica bubrega miša je nefron kao kod ljudi. Mišji bubrezi imaju oko 14 000 nefrona (29). Osim po broju nefrona, ove se vrste razlikuju po tome što miševi imaju veći broj nefrona dugih segmenata od kratkih (3:1), dok ljudi imaju veći broj nefrona kratkih segmenata nego dugih (7:1). Zbog toga mišji bubrezi imaju veću sposobnost koncentriranja mokraće, što rezultira visokom specifičnom težinom (~1,0341 g/ml) i proteinurijom (29). Ultrastrukturne značajke glomerula miša i čovjeka su uglavnom slične, s razlikom u veličini glomerula, koji su u miševa mnogo manji te u debljini bazalne membrane. Kod miševa je ona debela između 80-200 nm (28). Bubrege miševa karakterizira varijabilni spolni dimorfizam koji ovisi o soju i dobi, a uključuje veću veličinu bubrega, kuboidni parijetalni epitel Bowmanove čahure, površinsku kortikalnu tubularnu vakuolizaciju te veću proteinuriju kod mužjaka (28). Segmenti bubrežnih tubula miševa slični su kao kod ljudi. Ravni segmenti proksimalnih tubula se kod miševa dijele prema funkcionalnom kapacitetu u segmente S1, S2 i S3, koji se mogu identificirati elektronskim mikroskopom. JGA je sličan u obje vrste (29).

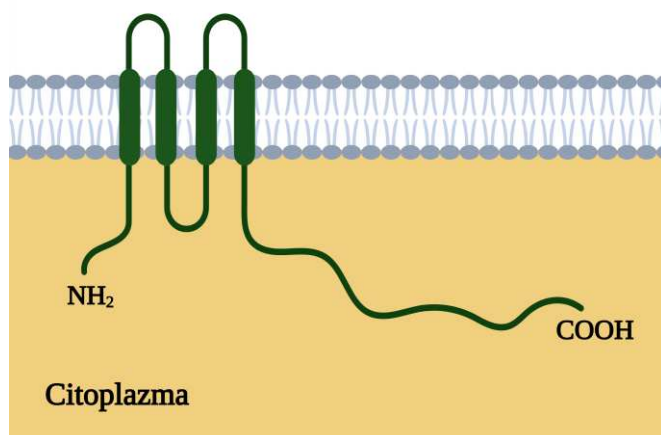
Funkcija bubrega miša odgovara funkciji bubrega čovjeka. Bubrezi miša proizvedu 0,5 - 1 ml mokraće na dan. Mokraća miša je koncentriranija od mokraće čovjeka zbog složenije vaskulature bubrega i većeg broja jukstamedularnih nefrona u odnosu na kortikalne, čije izrazito duge Henleove

petlje doprinose stvaranju visoko koncentriranog urina (29). Također, za razliku od drugih vrsta, miševi izlučuju velike količine proteina u mokraći u fiziološkim uvjetima, njihov urin sadrži taurin i nedostaje mu triptofan, a izlučuju i kreatinin mokraćom (28).

## 1.2. Koneksini

Koneksini (eng. *connexins*, Cx) su obitelj transmembranskih proteina koji imaju važnu ulogu u međustaničnoj komunikaciji u mnogim tkivima, uključujući bubrege (30). Obitelj ovih proteina se sastoji od 21 izoforme kod ljudi i 20 izoformi kod glodavaca, s izrazitom homologijom između različitih Cx kod ljudi, štakora i miševa (30, 31). Svi Cx dijele istu molekularnu strukturu, uključujući četiri  $\alpha$ -spiralne transmembranske domene povezane dvjema izvanstaničnim petljama i jednom unutarstaničnom petljom te jednu citoplazmatsku amino-terminalnu regiju (NH<sub>2</sub>-kraj) i jednu citoplazmatsku karboksi-terminalnu regiju (COOH-kraj) (31) (Slika 2). Dvije izvanstanične petlje su ključne za interakciju sa susjednim stanicama, dok citoplazmatski amino i karboksi krajevi podliježu posttranslacijskim modifikacijama kojima se kontrolira aktivnost međustaničnih kanala (30, 32).

### Izvanstanični prostor

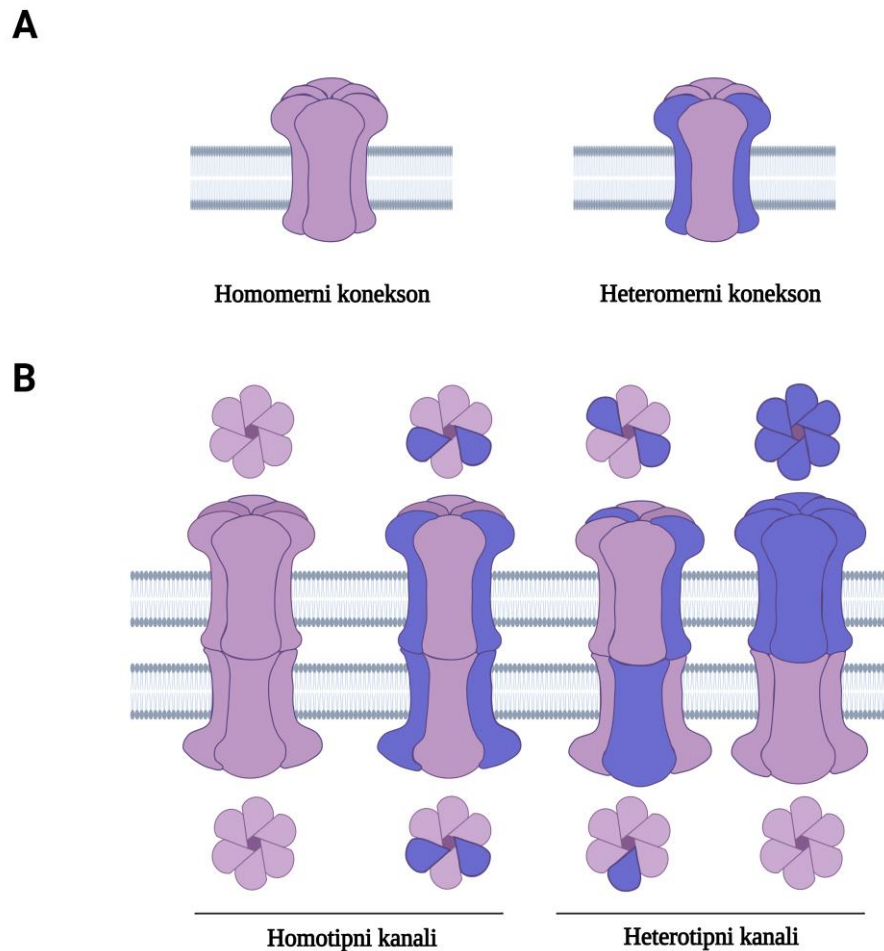


**Slika 2.** Prikaz građe koneksina. Slika je izrađena u programu BioRender.com.

Pojedinačni Cx se obično opisuju svojom molekulskom masom u kilodaltonima (primjerice, Cx43 je koneksin koji ima molekulsku masu od 43 kDa) (33, 34). Izražaj svakog Cx je visoko specifičan za pojedina tkiva ili tipove stanica, a većina organa i mnoge vrste stanica izražavaju više od jednog Cx (35).

Životni poluvijek Cx je kratak i iznosi svega nekoliko sati. Njihov životni ciklus započinje sintezom u endoplazmatskoj mrežici (ER), nakon čega oligomeriziraju u Golgijevom aparatu (36). Šest Cx oligomerizira kako bi stvorili prstenasti hemikanal s centralnom porom, konekson (30).

Heksamer koneksiona može se sastojati od jedne ili više izoformi Cx te se prema tome dijele na homomerne i heteromerne koneksone (37) (Slika 3A).



**Slika 3.** Koneksioni i međustanični kanali. A: Homomerni i heteromerni koneksioni. B: Međustanični kanali tijesnih spojeva, podjela na homotipne i heterotipne kanale. Slika je izrađena u programu BioRender.com.

Koneksioni se potom transportiraju do površine stanice, gdje se nalaze unutar specijaliziranih mikrodomena nazvanih lipidne splavi (36). Lipidne splavi su funkcionalne nakupine kolesterola, glikosfingolipida i proteina, a dio su membrane stanica kao i unutarstaničnih organela (primjerice ER) (38-40). Iako se ranije smatralo da je uloga lipidnih splavi sudjelovanje u transportu proteina i lipida, danas se pretpostavlja da su one središta za oblikovanje signalnih domena, uz važnu ulogu u kontroli neurotransmisije, endocitoze, apoptoze i regulaciji proteolize (41). Neki Cx kanali su osim u lipidnim splavima lokalizirani i u kaveolama, subpopulaciji lipidnih splavi, koji se razlikuju od drugih tipova po invaginiranoj morfologiji i monotopičnom proteinu kaveolinu-1 koji veže kolesterol (42-

44). Distribucija pojedinih Cx kanala se razlikuje u splavima s različitim sastavom lipida. Štoviše, pokazano je da specifična biofizička svojstva splavi mogu utjecati na funkciju Cx kanala (45), a tako i na međustaničnu komunikaciju posredovanu tijesnim spojevima koje tvore Cx kanali (46). Koneksoni u staničnoj membrani mogu postojati kao hemikanali ili se mogu spojiti sa koneksomom susjedne stanice i tvoriti međustanični kanal tijesnih spojeva (36).

Koneksozni hemikanali posreduju u komunikaciji stanične citoplazme s izvanstaničnim okolišem. Smatra se da su ovi kanali u fiziološkim uvjetima zatvoreni kako bi osigurali tkivnu homeostazu. Aktiviraju se ili moduliraju svoju aktivnost kao odgovor na mehanički ili ishemijski stres (47-50), a osjetljivi su i na promjene u unutarstaničnoj koncentraciji kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (51). Prema novijim istraživanjima koneksinski hemikanali doprinose patogenezi različitih upalnih bolesti, srčanoj ishemiji/reperfuziji kao i odgođenom cijeljenju rana (52-54). Oni također formiraju put za oslobađanje adenozin trifosfata (ATP-a), glutamata,  $\text{NAD}^+$  i prostaglandina E2 iz stanica, koji tada djeluju kao parakrini glasnici (55). Omogućavaju izmjenu iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) između stanice i izvanstaničnog prostora. Provodljivost, propusnost i regulatorna svojstva hemikanala ovise o sastavu koneksinskih podjedinica od kojih su sačinjeni (56).

Kada se konekson spoji sa koneksomom susjedne stanice nastaje međustanični kanal tijesnih spojeva koji omogućuje direktnu međustaničnu komunikaciju. Spajanjem dva jednaka koneksiona nastaju homotipni kanali, a spajanjem dva različita koneksiona nastaju heterotipni kanali (57) (Slika 3B). Više međustaničnih kanala se organizira u nakupine i tako tvore tijesne spojeve (eng. *gap junctions*, GJ) (58). Tijesni spojevi osiguravaju put za razmjenu malih hidrofilnih molekula (manjih od 1 kDa) među susjednim stanicama, poput glukoze, aminokiselina, cikličkog adenozin monofosfata (cAMP), ATP-a, inozitol trifosfata ( $\text{IP}_3$ ) te iona kalcija, natrija i kalija (31, 59, 60). Prolaz ovih molekula kontroliran je otvorenom i zatvorenom konfiguracijom kanala (61). Aktivnost koneksinskih kanala i njihov životni ciklus kontroliraju brojni mehanizmi. Precizna trenutna kontrola funkcionalnosti koneksinskih kanala putem usmjeravanja protoka i provodljivosti samih kanala događa se u rasponu od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, a regulirana je transmembranskim naponom, kalcijevim ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i vodikovim ( $\text{H}^+$ ) ionima te fosforilacijom, koja se uglavnom događa na karboksi-terminalnom dijelu Cx (62-65). Dugoročna kontrola aktivnosti koneksinskih hemikanala i kanala koji tvore tijesne spojeve događa se u rasponu od nekoliko sati, a regulirana je kontrolom izražaja Cx, dominantno peritranskripcijskom (31, 35). Različiti kontrolni mehanizmi koji reguliraju izražaj koneksinskih gena rezultiraju izražajem svakog Cx u uzorku specifičnom za tip stanice i razvojne promjene (35).

Na kraju svog životnog vijeka koneksini se internaliziraju u stanicu putem koneksosoma ili endosoma te se razgrađuju autofagijom ili pomoću lizosoma ili proteasoma. Objavljena istraživanja

sugeriraju da preferencija jednog razgradnog puta u odnosu na drugi ovisi o tipu stanice i da unutar istog tipa stanice odabrani razgradni put može ovisiti o metaboličkom ili patološkom stanju stanice (30).

Regulacija izražaja Cx se odvija u različitim fazama njihovog životnog ciklusa, počevši od DNA (transkripcija), preko RNA (translacija, lokalizacija, razgradnja) i konačno do proteina (transport do stanične membrane, organiziranje u hemikanale ili kanale tijesnih spojeva, usmjeravanje protoka, posttranslacijske modifikacije). Ovi regulacijski mehanizmi u konačnici utječu na broj kanala u staničnoj membrani te njihovu funkcionalnost i propusnost (66, 67). Kontinuirana sinteza i razgradnja koneksinima omogućava lakšu prilagodbu na fiziološke zahtjeve okoline u kojoj se nalaze (36, 47).

Koneksini su važni za normalan razvoj i fiziologiju širokog spektra organa, uključujući živčani sustav, kardiovaskularni sustav, reproduktivne organe i kožu (68-70). Njihova važnost proučavana je u različitim istraživanjima s isključivanjem gena za pojedine koneksine u eksperimentalnih životinja. Tako je primjerice pokazano da miševi s isključenim genom za Cx43 umiru pri rođenju zbog poremećenog razvoja srca, dok miševi s isključenim genom za Cx37 imaju poremećaj u sazrijevanju folikula i ovulaciji, što dovodi do neplodnosti (71, 72). Kod ljudi su mutacije različitih Cx identificirane kao uzrok nekoliko genetskih bolesti, uključujući kataraktu, gluhoću, X-vezanu Charcot-Marie-Tooth bolest, kožne bolesti i okulodentodigitalnu displaziju (73, 74). Koneksinski hemikanali i međustanični kanali tijesnih spojeva također su uključeni u regulaciju različitih fizioloških procesa, zbog čega svaka njihova promjena doprinosi homeostatskoj neravnoteži i patologiji (47). U brojnim je istraživanjima potvrđena ključna uloga međustanične komunikacije putem tijesnih spojeva u održavanju tkivne homeostaze (62-64). Tijesni spojevi sudjeluju u mnogim fiziološkim i patofiziološkim procesima, kao što su rast ili hiperplazija stanica (75), regeneracija tkiva, karcinogeneza (76) te izlučivanje i djelovanje hormona (77), zbog čega je važno poznavati sposobnost regulacije izražaja i funkcije koneksina.

### **1.2.1. Izražaj koneksina u bubrezima**

Devet je različitih izoformi Cx izraženo u bubrezima: Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Cx46. Njihov izražaj varira u različitim regijama bubrega i različitim dijelovima nefrona (33).

Pretpostavlja se da su hemikanali i tijesni spojevi u bubrežnim tubulima uključeni u reapsorpciju soli i vode. U proksimalnom tubulu su izraženi Cx26 i Cx32 (78, 79), u tankom kraku Henleove petlje izražen je Cx30.3 (80), u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje Cx37 (81), čiji izražaj se mijenja ovisno o unosu soli, dok su na apikalnim dijelovima interkaliranih stanica distalnih

tubula i sabirnih kanalića izraženi Cx30.3 i Cx30 (80, 82), od kojih Cx30 potencijalno ima važnu ulogu u kontroli krvnog tlaka (83). Tijesni spojevi su kao takvi pronađeni samo u proksimalnom zavijenom tubulu, dok u preostalim dijelovima tubularnog sustava nefrona unatoč snažnom izražaju koneksina nisu potvrđeni (84). Mogući razlog je da u tubulima izraženi Cx ne tvore tijesne spojeve, nego funkcioniraju kao hemikanali, a također je moguće i da tvore tijesne spojeve, ali im je broj toliko mali da nije detektabilan korištenim tehnikama (33).

Za razliku od tubularnog sustava, u bubrežnoj vaskulaturi je dokazana prisutnost brojnih tijesnih spojeva, kao i unutar svih stanica glomerula (85-87). Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 su izoforme koneksina izražene u bubrežnoj vaskulaturi (33). U endotelnim stanicama izraženi su Cx37, Cx40 i Cx43 (88, 89), dok su u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila izraženi predominantno Cx45 i Cx43 (33). Stanice koje luče renin uglavnom izražavaju Cx45, i u nešto manjoj mjeri Cx37 (89-91), dok su o izražaju Cx43 u ovim stanicama različiti rezultati istraživanja (92, 93). Ekstraglomerularne stanice izražavaju Cx40, dok o izražaju Cx37 i Cx45 postoje proturječni rezultati istraživanja (90, 92, 94). U intraglomerularnim mezangijskim stanicama izraženi su Cx40, Cx37 i povremeno Cx45 (89, 91, 92), dok su među podocitima tijesni spojevi građeni uglavnom od Cx43 (95).

U bubrežima ovi Cx imaju funkcionalnu ulogu u nekoliko regulacijskih mehanizama, uključujući regulaciju lučenja renina, tubuloglomerularnu povratnu spregu i reapsorpciju soli i vode. Na sistemskoj razini, bubrežni Cx mogu doprinijeti regulaciji krvnog tlaka i sudjelovati u patogenezi hipertenzije i dijabetesa (33).

### 1.3. Paneksini

Paneksini (eng. *pannexins*, Panx) su transmembranski proteini, strukturno slični koneksinima. Čine ih četiri transmembranske domene povezane dvjema izvanstaničnim petljama i jednom unutarstaničnom petljom te unutarstanični amino i karboksi krajevi (96). Tri su člana obitelji ovih proteina, Panx1, Panx2 i Panx3, sa značajnom homologijom u ljudi i miševa (97).

Najzastupljeniji je Panx1 koji je izražen u različitim tkivima i vrstama stanica, kao što su mozak, srce, skeletni mišići, koža, timus, testisi, jajnici, placenta, prostata, pluća, tanko i debelo crijevo, jetra, gušterača, slezena, eritrociti, limfociti, endotelne i epitelne stanice, dok je izražaj ostalih paneksina ograničen na pojedina tkiva, s istaknutim izražajem Panx2 u središnjem živčanom sustavu i Panx3 u tkivima kože i skeleta (98, 99). Samo Panx1 i Panx3 su izraženi u bubrežima (100).

Pojedinačni Panx oligomeriziraju i tako tvore prstenasti kanal panekson (101, 102). Potrebno je šest podjedinica za formiranje Panx1 kanala, dok Panx2 kanale najvjerojatnije čini sedam ili osam podjedinica (98, 101). Ovi kanali stanične membrane ne tvore tijesne spojeve, za razliku od Cx, od



kojih ih također razlikuje značajno duže vrijeme poluživota (103). Panx1 kanale može aktivirati mehanička stimulacija, aktivacija kaspaze, citoplazmatski  $Ca^{2+}$ , depolarizacija membrane te izvanstanične razine ATP i  $K^+$  (104-110), dok ih deaktiviraju citoplazmatska acidifikacija posredovana  $CO_2$  (107), negativna povratna sprega od oslobađanja ATP-a (111), mimetički peptidi (112) i blokatori kanala kao što su karbenoksolon, probenecid i flufenaminska kiselina (113, 114). Ovisno o načinu podražaja paneksoni imaju dvije konformacije te se tako razlikuju kanali velike vodljivosti i neselektivne propusnosti za molekule manje od 1,5 kDa i kanali male vodljivosti, selektivni za kloride (115).

Panx1 kanali omogućavaju komunikaciju stanice s izvanstaničnim okolišem. Kontroliraju oslobađanje ATP-a i drugih nukleotida iz mnogih tipova stanica, a poznato je da njihova aktivacija pokreće parakrinu signalizaciju koja kontrolira vazokonstrukciju i vazodilataciju, kalcijску signalizaciju, mukocilijarno čišćenje dišnih putova i funkcioniranje okusnih pupoljaka te se pokazalo da u gliomima djeluju kao tumorski supresori (106, 116-119). Također sudjeluju u apoptozi, aktivaciji i migraciji stanica imunološkog sustava, a njihova uloga je dokazana u epileptičkim napadajima i olakšavanju HIV-1 infekcije (119, 120).

### **1.3.1. Izražaj paneksina u bubrezima**

Panx1 je izražen u bubrežnim krvnim žilama i tubularnom sustavu. U bubrezima miševa je utvrđen njegov izražaj u apikalnom dijelu stanica bubrežnih tubula, uključujući PCT, tanke silazne krakove Henleove petlje i sabirne kanaliće, dok je u bubrežnim krvnim žilama izražen u glatkim mišićnim stanicama bubrežnih arterija, uključujući aferentne i eferentne arteriole, kao i u podocitima (100, 121, 122). U postnatalnom ljudskom bubregu pronađen je izražaj Panx1 u proksimalnim tubulima, stanicama koje proizvode renin i medularnim i kortikalnim sabirnim kanalićima, u manjoj mjeri u distalnim tubulima i tankim silaznim krakovima Henleove petlje te u podocitima. Za razliku od mišjih bubrega, nije pronađen izražaj Panx1 u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, dok je bio prisutan u endotelu (123).

Smatra se da Panx1 u bubrezima regulira otpuštanje ATP-a u lumen tubula i krvnih žila te tako sudjeluje u kontroli funkcije krvnih žila i bubrežnog epitelnog transporta tekućine i elektrolita (121). Također sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, s obzirom na to da je dokazano da Panx1 kanali u stanicama koje luče renin kontroliraju lučenje renina u fiziološkim uvjetima (124).

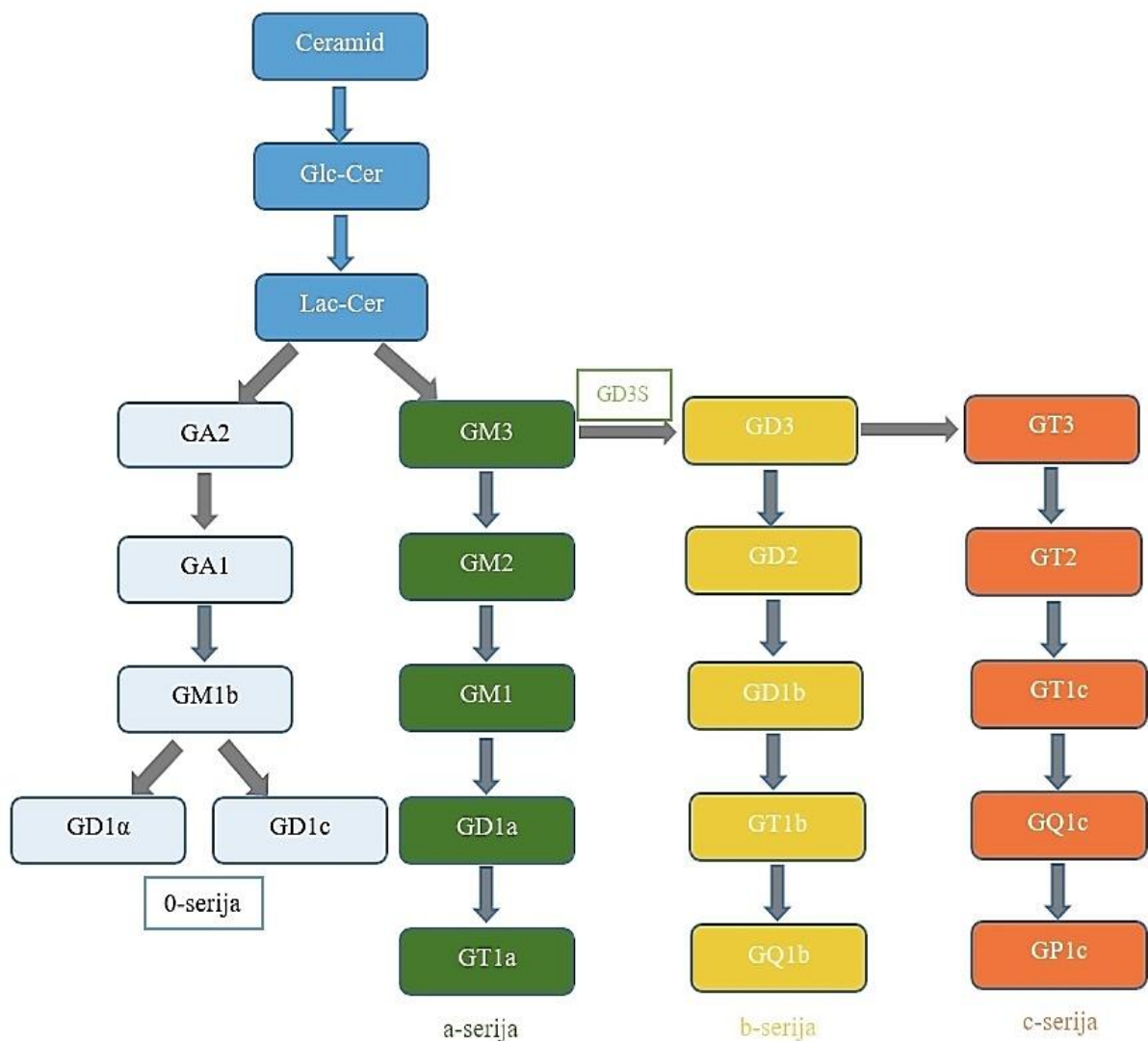
Osim njegove važnosti u kontroli krvnog tlaka, postoje dokazi o ulozi Panx1 u patofiziologiji inzulinske rezistencije i šećerne bolesti. Aktivnost Panx1 kanala regulira unos glukoze stimuliran inzulinom u adipocitima, čime doprinosi kontroli metaboličke homeostaze, a također je dokazano da je kod pretilih ljudi u masnom tkivu izražaj Panx1 povećan i izravno korelira sa stupnjem inzulinske

rezistencije (98). Prema nedavnom istraživanju glomerularni izražaj Panx1 je potencijalni indikator pogoršanja bubrežne funkcije u pacijenata sa šećernom bolesti tip 2 (123).

#### 1.4. Gangliozidi

Gangliozidi su podrazred glikosfingolipida (GSL), a karakterizira ih građa od ceramidnog lipidnog sidra i šećernog lanca s jednom ili više sijalinskih kiselina. Važan su dio stanične membrane, gdje u interakciji s fosfolipidima, kolesterolom i transmembranskim proteinima čine lipidne splavi (125). Kao ključne komponente membrane, gangliozidi su uključeni u regulaciju stanične signalizacije, međustanične komunikacije, invazije patogena, apoptozu/preživljavanje stanica, proliferaciju/diferencijaciju i funkciju imunoloških stanica (126). Pojedinačni gangliozidi su definirani Svennerholmovom nomenklaturom, prema kojoj slovo G označava gangliozid, slova M, D, T, Q i P označavaju broj sijalinskih kiselina na molekulama (M=1 sijalinska kiselina, D=2 sijalinske kiseline...), dok se brojevi 1, 2, 3, itd. odnose na redoslijed migracije gangliozida na tankoslojnoj kromatografiji (127). Glikosfingolipidi ganglio-serija klasificirani su u gangliozide asialo-, a-, b- i c-serije, ovisno o tome imaju li 0, 1, 2 ili 3 ostatka sijalinske kiseline pričvršćena na unutarnji ostatak galaktoze (128).

Do sada je poznato više od 200 gangliozida koji se međusobno razlikuju po sastavu šećernog lanca (129). Sveprisutni su u tkivima, a posebno su obilno izraženi u središnjem živčanom sustavu sisavaca (130). Njihova prisutnost u stanicama je čvrsto regulirana uravnoteženim izražajem i funkcijom gangliozid sintaza, enzima odgovornih za njihovu biosintezu, i glikozidaza, enzima odgovornih za njihovu razgradnju (126). Strukturni temelj svih GSL je ceramid, iz kojeg u ER glikozilacijom nastaje glukozilceramid (GlcCer). U Golgijevom aparatu galaktozilacijom GlcCer nastaje laktozilceramid (LacCer), metaboličko središte za sintezu svih složenijih GSL (131). Sintaza gangliozida uključuje postupno djelovanje različitih glikozil i sijaliltransferaza (128, 132, 133) (Slika 4). Dodavanjem sijalinske kiseline na LacCer djelovanjem GM3 sintaze nastaje najjednostavniji gangliozid u ovom sintetskom putu, GM3, koji je tako i prekursor svih gangliozida a-, b- i c- serije (131). Izražaj glikoziltransferaza uključenih u sintezu gangliozida je prostorno i vremenski reguliran na transkripcijskoj i posttranslacijskoj razini, a promjene njihovog izražaja u velikoj mjeri utječu na promjene izražaja gangliozida tijekom razvoja ili bolesti (134). Blokiranje biosintetskih puteva gangliozida u određenom koraku sinteze rezultira promjenom gangliozidnog profila, što može uzrokovati nedostatak i/ili nakupljanje određenih gangliozida ovisno o blokiranom mjestu u sintezi (135).



**Slika 4.** Shematski prikaz biosinteze 0-, a-, b- i c-serija gangliozida i mjesto djelovanja GD3 sintaze (GD3S). Izradila autorica.

Kroz interakciju s drugim komponentama membrane, molekulama susjednih membrana i izvanstaničnim matriksom gangliozidi su uključeni u vitalne stanične procese, poput rasta stanica, međustaničnog prepoznavanja, stanične adhezije, provođenja signala, proliferacije, diferencijacije i autofagije (128, 136-138). Djelovanjem na različite transmembranske receptore, uključujući receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), receptor faktora rasta porijeklom iz trombocita (PDGFR), receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGFR), receptor faktora rasta hepatocita (c-Met),

inzulinski receptor (InsR), receptor faktora rasta nalik inzulinu 1 (IGF1R) i leptinski receptor, reguliraju njihovu funkciju u putevima provođenja signala (139-142). Tako primjerice GM3 regulira signaliziranje EGFR i InsR lateralnim interakcijama s ovim receptorima, a povećan izražaj GM3 utječe na razvoj inzulinske rezistencije (143-146). Stoga, promjene u sastavu gangliozida, modifikacije gangliozida i prisutnost ili odsutnost određenih vrsta gangliozida mogu dovesti do promjena u staničnom metabolizmu.

Učinci promijenjenog sastava gangliozida mogu se analizirati selektivnim isključivanjem određenih enzima biosintetskog puta kod miševa. Primjerice, miševima koji nemaju gen *St8sial* koji kodira  $\alpha$ -N-acetilneuraminat- $\alpha$ -2,8-sijaliltransferazu (EC 2.4.99.8; *St8sial knockout* miševi [KO]) nedostaje enzim GD3 sintaza. Ovaj nedostatak dovodi do nakupljanja gangliozida a-serije (GM3, GM2, GM1, GD1a) i manjka gangliozida b- i c-serije (GD3, GD2, GD1b, GT1b, GT3, GT2, GT1c) (147). Iako ukupna koncentracija gangliozida u KO miševa ostaje ista kao u miševa divljeg tipa (WT), gubitak određenih gangliozida značajno mijenja njihov sastav (135).

*St8sial* gen se nalazi na p kraku 12. kromosoma. Kodira GD3 sintazu, jedini enzim koji katalizira prijenos sijalinske kiseline na GM3, pri čemu nastaje GD3 (148) (Slika 4). Stoga je GD3 sintaza ključni enzim koji kontrolira biosintezu kompleksnih gangliozida iz b- i c- serije (149, 150). *St8sial* gen je jako izražen u nekoliko tumora, uključujući melanom, gliom, karcinom dojke i svjetlostanični karcinom bubrega te igra važnu ulogu u razvoju i napredovanju karcinoma (151, 152). Blokiranjem GD3 sintaze blokirala bi se biosinteza GD3 i GD2, dva vrlo važna gangliozida koji imaju bitnu ulogu u nastanku tumora i njegovom razvoju i metastaziranju, zbog čega su u tijeku istraživanja blokatora GD3 sintaze za svrhu ciljanog liječenja karcinoma kod ljudi (151).

Najzastupljeniji bubrežni gangliozid je GM3, koji čini tri četvrtine ukupnih gangliozida prisutnih u bubrežima, a nakuplja se pojačano kod miševa s nedostatkom enzima GD3 sintaze (153). Zajedno s gangliozidom GM1 čini lipidne splavi (154). Analizom uzoraka ljudskih bubrega potvrđena je specifična prisutnost GM3 u nožicama podocita (155). GM3 u lipidnim splavima na površini ljudskih podocita pospješuje adheziju i brzu reorganizaciju aktina (156). Zbog njegove visoke zastupljenosti u podocitima smatra se da je uključen u održavanje naboj-selektivne filtracijske barijere glomerula putem regulacije funkcije podocita (126), a njegov izmijenjeni izražaj može biti važan čimbenik u pogoršanju bubrežne funkcije u patogenezi dijabetičke nefropatije (126, 157-162). Obilje GM3 u podocitima također sugerira njegovu ulogu u patofiziologiji glomerulopatija (126).

U šećernoj bolesti je utvrđena pozitivna korelacija između povećanja razine završnih produkata glikacije (eng. *Advanced Glycation End products* - AGE) i povećanih razina gangliozida a-serije u mezangijalnim stanicama bubrega štakora, s posebnim povećanjem izražaja GM3, GM2 i GM1 (160). Porast koncentracije gangliozida je praćen značajnim povećanjem izražaja gangliozid

sintaza potrebnih za proizvodnju odgovarajućih gangliozida te inhibicijom sintaza koje posreduju proizvodnju gangliozida izvedenih iz GM3, što dodatno povećava razine GM3 s obzirom na to da se u tom slučaju ne koristi kao prekursor za druge vrste gangliozida. Pretpostavlja se da upravo gangliozidi a-serije posreduju učinke AGE na proliferaciju bubrežnih mezangijalnih stanica i tako utječu na razvoj mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti, u prvom redu dijabetičke retinopatije i dijabetičke nefropatije (160). Pronađen je povećan izražaj GM3 u tubulima bubrega štakora s oba tipa šećerne bolesti u odnosu na kontrolne životinje, što implicira njegovu ulogu u ranoj patogenezi dijabetičke nefropatije (163). O ulozi GM3 u kaskadi koja vodi do dijabetičke nefropatije govore i rastući dokazi o njegovim negativnim modulatornim učincima na signalne putove posredovane inzulinom (157, 159, 161, 162). To potvrđuje povećana osjetljivost na inzulin u miševa kojima nedostaje GM3 (162). Pretpostavlja se da nakupljanje GM3 u hiperglikemiji dovodi do iscrpljivanja funkcionalnog bubrežnog parenhima kroz aktivnosti koje uključuju grupiranje gangliozida u lipidnim splavima (157).

Uzimajući u obzir sve navedeno, poremećaj sastava gangliozida u bubrezima *St8sial1*-KO miševa može biti dobar model za proučavanje promjene sastava gangliozida i svojstava lipidnih splavi u dijabetičkim uvjetima.

### **1.5. Miševi s isključenim genom *St8sial1***

*St8sial1*-KO miševi se uglavnom normalno razvijaju i trajanje životnog vijeka im je uobičajeno, uz neke suptilne nedostatke, poput smanjenog obnavljanja oštećenih podjezičnih živaca, toplinske hiperalgezije (povećane osjetljivosti na toplinski bolni podražaj), alodinije (smanjenog praga podražljivosti na bol, pri čemu podražaji koji inače ne izazivaju bol bivaju percipirani kao bolni) te smanjenog odgovora na produljeni štetni podražaj (147, 164). Gangliozidi b-serije koji uključuju GD3, GD2, GD1b, GT1b i GQ1b imaju ključnu ulogu u održavanju osjetnog dijela živčanog sustava, obnavljanju podjezičnih živaca nakon ozljede i lučenju leptina u masnom tkivu (147, 164, 165). Ovi gangliozidi su također identificirani kao antigeni povezani s karcinomom i poznati su po povećavanju malignih svojstava tumora, poput proliferacije stanica i invazije u melanomu, osteosarkomu i sitnostaničnom karcinomu pluća (166-168). Razina izražaja mRNA GD3 sintaze i/ili GD2 sintaze je često povećana kod karcinoma u usporedbi sa zdravim kontrolama i može se uzeti u obzir kao marker malignosti povezan s histopatološkim stupnjevanjem i/ili prognozom (169, 170). Iz navedenog bi se moglo zaključiti da će miševi s isključenim *St8sial1* genom biti manje skloni razvoju ranije nabrojanih tumora zbog nedostatka gangliozida b-serije. Promotorska regija gena *St8sial1* opisana je u melanomu (171, 172), glioblastomu (173) i staničnim linijama raka dojke

(174). Sve to čini gangliozide obećavajućim metama za imunoterapiju raka, posebno u kombinaciji s već poznatim lijekovima. Sastav gangliozida za svaki tip tumora ima veliki utjecaj na učinkovitost tretmana, koji se mora prilagoditi specifičnom molekularnom uzorku tumora (175).

Pri nedostatku gangliozida b-serije smanjena osjetljivost osjetnih živaca koja nastaje kao posljedica degeneracije živaca može izazvati prekomjerno češanje i lezije kože (176), što je primijećeno kod *St8sial*-KO miševa. Nadalje, podaci nove studije na *St8sial*-KO miševima istraživali su utjecaj nedostatka ovog gena na metabolizam kosti te su pokazali da nedostatak GD3 sintaze smanjuje gubitak koštane mase koji se javlja starenjem (177). Nakupljanje gangliozida serije-a pozitivno regulira signale posredovane leptinom/leptinskim receptorom u hipotalamusu miševa s nedostatkom GD3 sintaze (141).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi distribuciju Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u različitim subpopulacijama stanica bubrega kao i učinke specifično promijenjenog sastava gangliozida na izražaj Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u različitim dijelovima bubrega miševa s isključenim *St8Sial* genom.



### **3. HIPOTEZA**

S obzirom na to da promijenjeni sastav gangliozida utječe na raspodjelu proteina u lipidnim splavima različitih staničnih membrana te tako vjerojatno utječe na distribuciju, transport i funkciju različitih izoformi koneksina, za pretpostaviti je da će nedostatak enzima GD3 sintaze kod *St8sia1*-KO miševa dovesti do promjena u izražaju Cx 37, 40, 43 i 45 te Panx1 u bubregu, što je vjerojatno povezano s promjenom sastava gangliozida.

#### **4. MATERIJALI I METODE**

## 4.1. Eksperimentalne životinje

U pokus je bilo uključeno dvanaest mužjaka miševa starih šest mjeseci: četiri kontrolna miša divljeg tipa (C57BL/6 soj, WT) i osam miševa s isključenim *St8sia1* genom (*St8sia1*-KO). *St8Sia1*-KO miševi izvorno su dobiveni od Centra za resurse i istraživanje mutantnih miševa Sveučilišta Missouri (*St8sia1*<sup>tm1Rlp</sup>). Životinje su bile smještene u samoventilirajuće kaveze, s pet izmjena zraka u minuti, u kontroliranim uvjetima okoliša (na stabilnoj sobnoj temperaturi ( $21 \pm 2$  °C) i vlažnosti zraka 40%-60%), s ciklusom svjetla/tame od 12/12 sati. Hranjeni su standardnom laboratorijskom hranom (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija).

## 4.2. Postupci

### 4.2.1. Uzimanje uzoraka i priprema bubrežnog tkiva za imunohistokemiju

Nakon primjene opće anestezije (Narketan®, 80 mg/kg + Xylapan®, 12 mg/kg, Vétoquinol, Bern, Švicarska), miševi su eutanazirani dekapitacijom. Bubrezi su odmah uklonjeni i fiksirani uranjanjem u puferirani 4% formalin. Tijekom pripreme za imunohistokemiju tkiva su isprana u fiziološkoj otopini fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer saline*-PBS, pH 7,2), zatim dehidrirana u otopinama etanola rastuće koncentracije (od 75% do 100%), razbistrena u ksilenu i uklopljena u parafin. Parafinski blokovi su izrezani na rezove debljine 5  $\mu$ m pomoću mikrotoma (Leica RM2155, Pittsburgh, PA, SAD) i zatim postavljeni na stakalca. Korišten je standardni postupak deparafinacije u ksilenu (tri puta po 5 minuta), nakon čega je slijedila rehidracija tkiva u otopinama etanola padajuće koncentracije (2 puta po 10 minuta u 100%, zatim jednom u 95% i jednom u 70%) uz kratko ispiranje destiliranom vodom. Presjeci bubrega su zatim grijani u citratnom puferu (pH 6,0) u parnoj kupelji tijekom 30 minuta za otkrivanje antigena, ohlađeni na sobnu temperaturu i isprani PBS-om.

### 4.2.2. Imunohistokemija

Nakon hlađenja na sobnu temperaturu i ispiranja u PBS-u, rezovi su prekriveni otopinom za blokiranje nespecifičnog vezanja (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) tijekom 20 minuta i zatim inkubirani preko noći s primarnim protutijelima na sobnoj temperaturi (Tablica 1). Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, uzorci su tri puta isprani PBS-om i inkubirani s odgovarajućim sekundarnim protutijelima jedan sat na sobnoj temperaturi (Tablica 1). Uzorci su zatim isprani u PBS-u. Provedeno je dvominutno DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) bojenje kako bi se vizualizirale jezgre. Nakon ispiranja destiliranom vodom, stakalca su osušena na zraku i prekrivena pokrovnim stakalcem uz korištenje medija za uklapanje (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD).

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

	<b>Protutijelo</b>	<b>Kataloški broj</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Primarna protutijela</b>	Anti-Cx37/GJA4	ab181701	Kunić	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-Cx40/GJA5	ab213688	Kunić	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-Cx43/GJA1	ab87645	Koza	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-Connexin 45/GJA7/Cx45	ab135474	Kunić	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-pannexin 1/PANX1	ABN242	Kunić	1:100	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	Anti-Aquaporin 1/AQP1 (B-11)	sc-25287	Miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
	Anti-Aquaporin 2/AQP2 (E-2)	sc-515770	Miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
	Anti-Smooth Muscle Actin	M0851	Miš	1:300	Dako, Glostrup, Denmark
<b>Lektini</b>	Fluorescein labeled <i>Dolichos Biflorus</i> agglutinin (DBA)	FL-1031	-	1:400	Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK
	Fluorescein labeled Lotus Tetragonolobus lectin (LTL)	FL-1321	-	1:400	Vector Laboratories Ltd.,

					Peterborough, UK
<b>Sekundarna protutijela</b>	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 AffiniPure Anti- Goat IgG (H+L)	705-545- 003	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories,  Inc., Baltimore, PA, USA
	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 AffiniPure Anti- Rabbit IgG (H+L)	711-545- 152	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories,  Inc., Baltimore, PA, USA
	Rhodamine Red <sup>™</sup> -X (RRX) AffiniPure Anti-Mouse IgG (H+L)	715-295- 151	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories,  Inc., Baltimore, PA, USA
	Rhodamine Red <sup>™</sup> -X (RRX) AffiniPure Donkey Anti- Rabbit IgG (H+L)	711-295- 152	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories,  Inc., Baltimore, PA, USA
	Rhodamine Red <sup>™</sup> -X (RRX) AffiniPure Anti-Goat IgG (H+L)	705-295- 003	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories,  Inc., Baltimore, PA, USA

### 4.2.3. Prikupljanje i analiza podataka

Obojeni presjeci bubrega pregledani su fluorescencijskim mikroskopom (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) uz povećanje objektiva od 40x te su fotografirani hlađenom digitalnom kamerom DS-Ri2 (Nikon, Tokyo, Japan) sa softverom NIS-Elements F (Nikon, Tokyo, Japan). Kako bi se kvantificirala imunoekspresija Cx i Panx1, analizirana su nepreklapajuća vidna polja dobivena pri povećanju od 40x uz konstantno vrijeme izlaganja. Ovisno o području veličine presjeka, snimljeno je 18-20 vidnih polja za analizu kore (CTX.); 6 za vanjski sloj vanjske medule (O.S.); 3-4 za unutarnji sloj vanjske medule (IN.S.) i 2-4 za unutarnju medulu (IN.MED.). Zelene granularne nakupine interpretirane su kao pozitivna imunoekspresija Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1.

Kako bi se opisala distribucija pojedinih Cx i Panx1 u različitim staničnim subpopulacijama bubrega, korištena su dvostruka imunofluorescentna bojanja s biljezima za pojedine vrste stanica: za epitel proksimalnih tubula korišten je *Lotus tetragonolobus* lektin (LTL), za epitel distalnih tubula korišten je *Dolichos biflorus* aglutinin (DBA), za tanki krak Henleove petlje korišten je akvaporin 1 (AQP1), a za sabirne kanaliće korišten je akvaporin 2 (AQP2).

Kvantifikacija imunoreaktivnosti provedena je pomoću ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Slike su pripremljene za analizu oduzimanjem crvenog signala od zelene fluorescencije. Zatim je primijenjen filter medijana s radijusom od 7,0 piksela te je na crno-bijelim 8-bitnim fotografijama postavljen granični prag pomoću standardnog („default“) algoritma. Za svako vidno polje izmjeren je postotak površine pokrivene Cx/Panx imunofluorescencijom te integrirana gustoća, a za statističku analizu korištena je prosječna vrijednost svih odgovarajućih polja. Za potrebe slikovne prezentacije provedeno je oduzimanje pozadine i kontrasta.

### 4.3. Statistička analiza

Za statističku analizu korišten je softver PAST 3.22 (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo, Norveška). Normalnost podataka testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlika između dvije skupine testirana je Studentovim t-testom za nejednake varijance. Kako bi se usporedili različiti medularni i kortikalni dijelovi presjeka, korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) s Tukey-Kramer testom za višestruke usporedbe za zavisne uzorke.  $p < 0,05$  smatran je statistički značajnom razlikom.

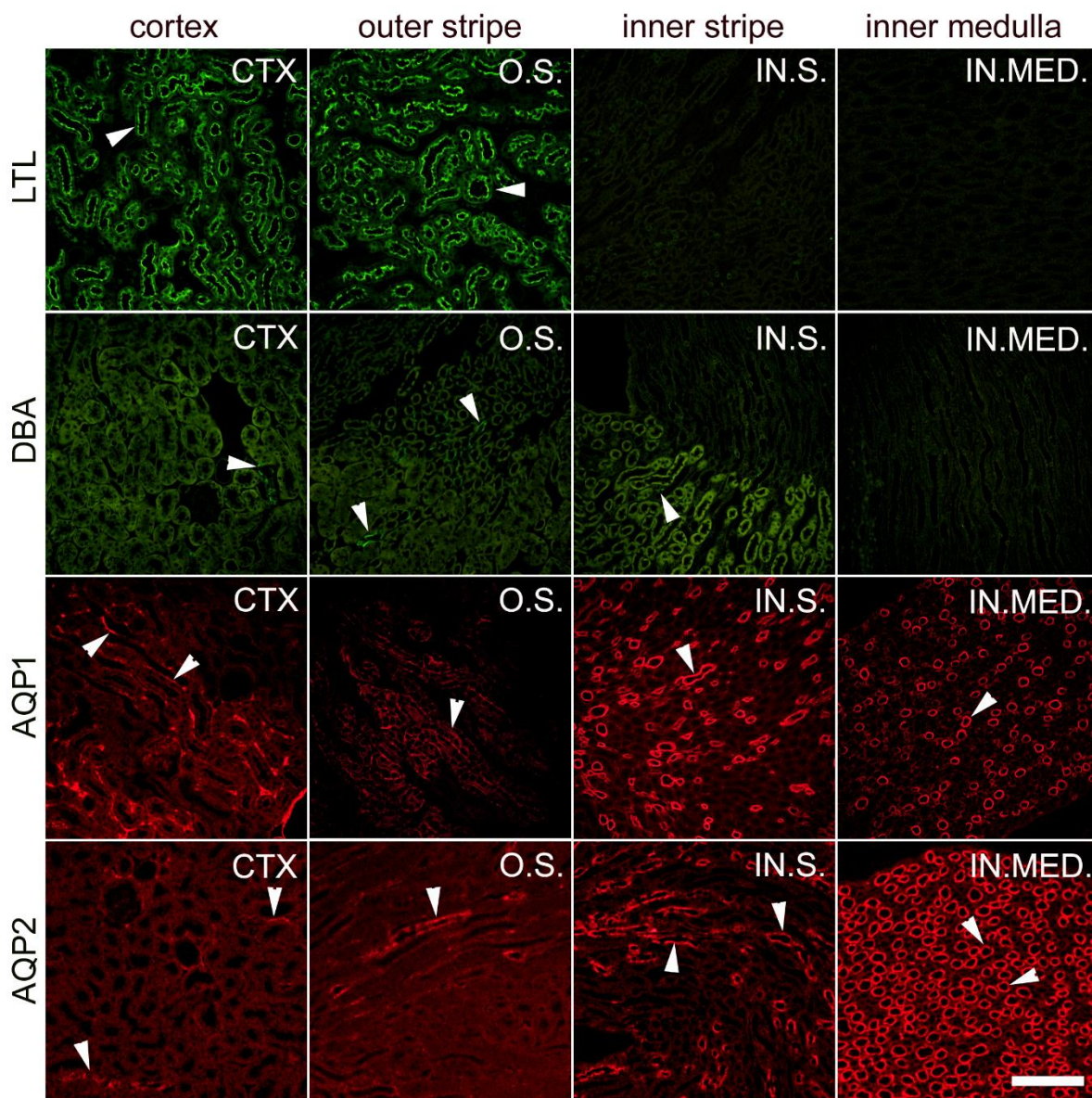
Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun su korišteni preliminarni podaci dobiveni analizom fotografija kore bubrega za Cx37, sa sljedećim parametrima;  $\mu_1 = 13$ ,  $\mu_2 = 11$ ,  $\sigma = 1$ ,  $\text{power} = 80\%$ ,  $p = 0,05$ .

## **5. REZULTATI**

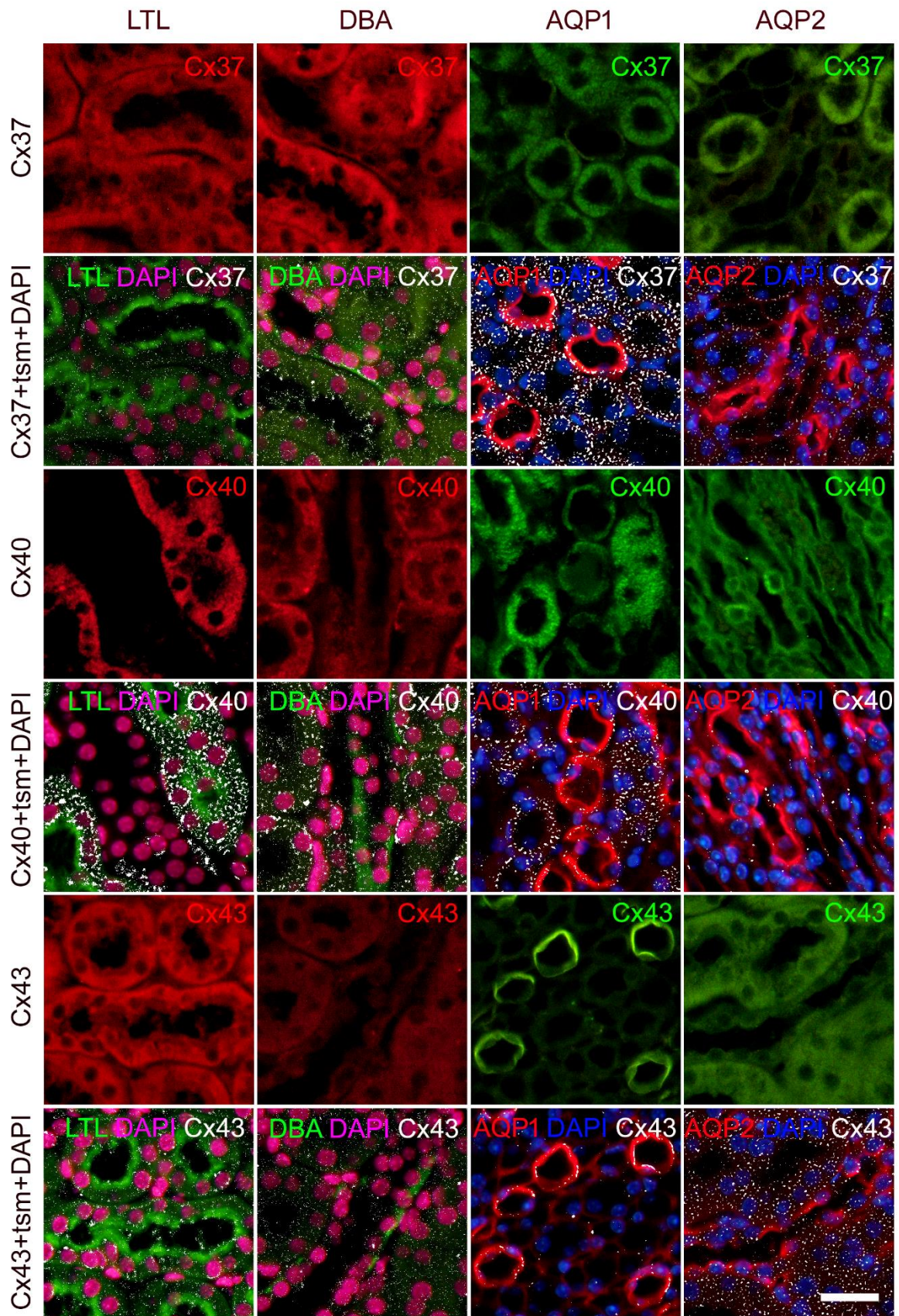


## 5.1. Izražaj koneksina 37 u bubrezima miševa divljeg tipa i *St8sia1*-KO miševa

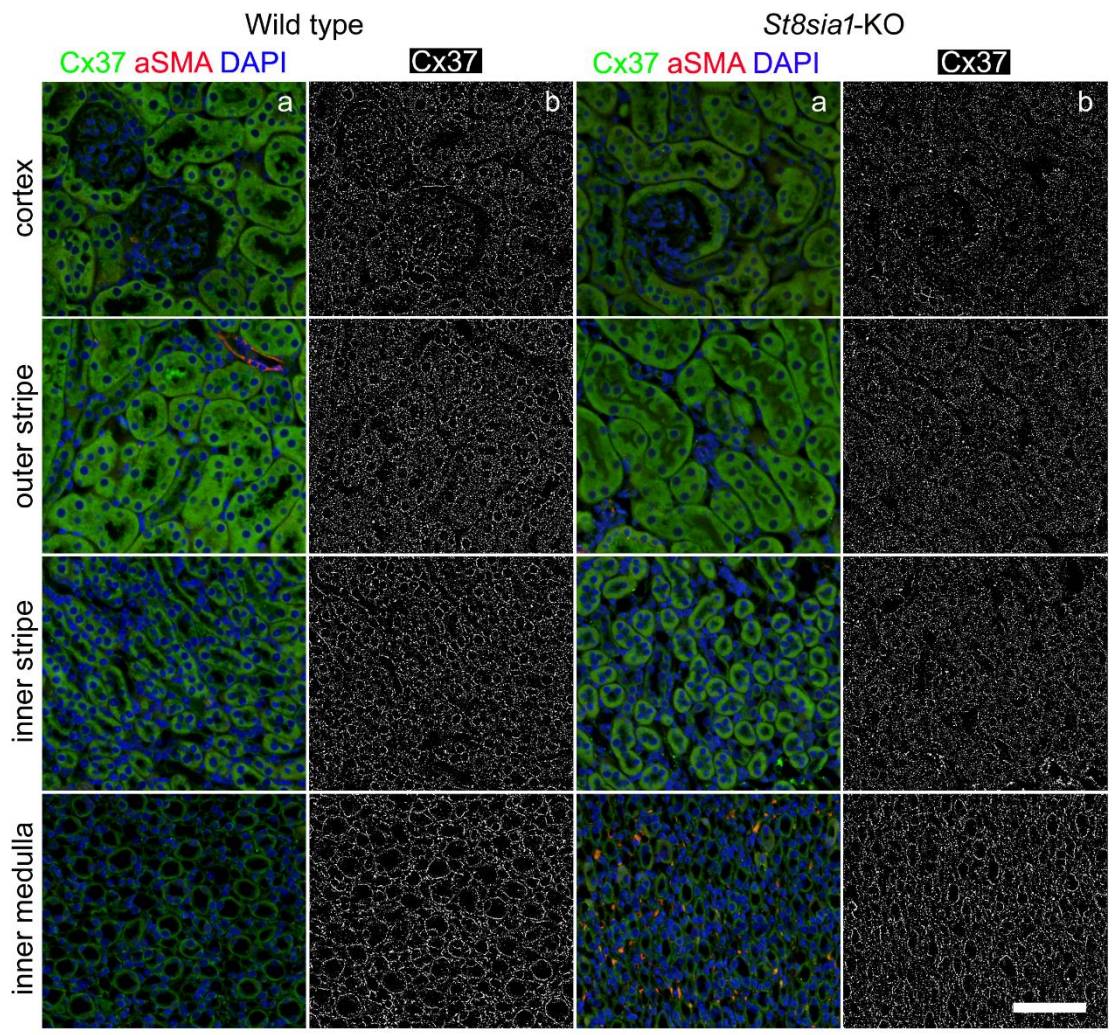
Raspodjela različitih biljega tubularnih segmenata koje smo koristili za lokalizaciju izražaja Cx u različitim dijelovima bubrega miševa prikazana je na Slici 5. Utvrđeno je da je Cx37 obilno izražen u svim tubularnim strukturama u kori i unutarnjoj i vanjskoj meduli te glomerulima u bubrezima i WT i *St8sia1*-KO miševa (Slike 6 i 7). Dvostrukim fluorescentnim bojenjem LTL-om prikazana je prisutnost Cx37 u epitelnim stanicama proksimalnih tubula, dok je kolokalizacija s biljekom distalnih tubula – DBA, otkrila njegovu prisutnost u epitelu distalnih tubula. U meduli, dvostruko fluorescentno bojenje AQP1 pokazalo je najjači izražaj Cx37 u AQP1-imunoreaktivnom epitelu tankog silaznog kraka Henleove petlje i u AQP1-negativnom epitelu debelog uzlaznog kraka, dok je rijetko prisutan bio u AQP2-imunoreaktivnim stanicama sabirnih kanalića (Slika 6). Analizom je verificiran značajno niži postotak površine prekriven imunofluorescencijom Cx37 ( $p = 0,0110$ ) i integrirana gustoća (I.D.;  $p = 0,0231$ ) u CTX.; O.S. (% površine  $p = 0,0012$ ; I.D.  $p = 0,0273$ ) i u IN.S. (% površine  $p = 0,0097$ ; I.D.  $p = 0,0018$ ) u *St8sia1*-KO miševa, u usporedbi s miševima divljeg tipa (Slika 7). U WT miševa, najviša integrirana gustoća Cx37 pronađena je u IN.MED. Bila je značajno veća u usporedbi s CTX ( $p = 0,0084$ ), O.S. ( $p = 0,0048$ ) i IN.S. ( $p = 0,0274$ ). Isto je verificirano i za *St8sia1*-KO miševe ( $p < 0,0001$  za sve tri odgovarajuće usporedbe).



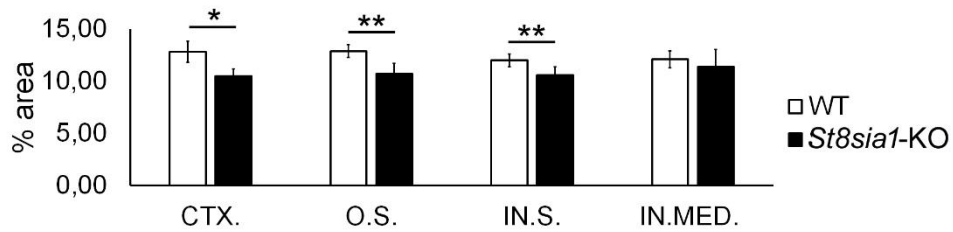
**Slika 5.** Raspodjela biljega tubularnih segmenata u različitim dijelovima mišjih bubrega. CTX. – kora; O.S. – vanjski sloj vanjske medule, IN.S. – unutarnji sloj vanjske medule; IN.MED. – unutarnja medula. Vežanje *Lotus tetragonolobus* lektina (LTL) bilo je specifično za proksimalne tubule smještene u kori i vanjskom dijelu vanjske medule (zeleno; prvi red). Vežanje *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) pronađeno je posebno u distalnim tubulima smještenim u kori te u vanjskim i unutarnjim dijelovima vanjske medule (zeleno; drugi red). Antitijelo protiv akvaporina 1 (AQP1) obojilo je proksimalne tubule u kori i vanjskom dijelu vanjske medule i tanki silazni krak Henleove petlje u unutarnjem dijelu vanjske medule i u unutarnjoj meduli (crveno; treći red), dok je antitijelo protiv akvaporina 2 (AQP2) obojilo različite segmente sabirnih kanalića u kori, vanjskoj meduli i unutarnjoj meduli (crveno; četvrti red). Mjerna skala = 40µm, odnosi se na sve (uvećanje 200×).



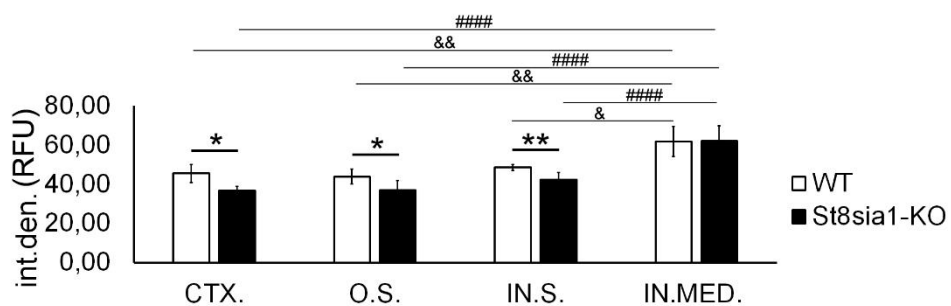
**Slika 6.** Kolokalizacija koneksina 37, 40 i 43 s različitim biljezima tubularnih segmenata u bubrezima miševa. Rezovi miševa divljeg tipa. *Lotus tetragonolobus* lektin (LTL), biljeg proksimalnih tubula (zeleno; prvi stupac); *Dolichos biflorus* aglutinin (DBA), biljeg distalnih tubula (zeleno; drugi stupac); akvaporin 1 (AQP1), biljeg tankog silaznog kraka Henleove petlje (crveno; treći stupac); akvaporin 2 (AQP2), biljeg sabirnih kanalića (crveno; četvrti stupac). Jezgre su obojene DAPI (plavo u trećem i četvrtom stupcu; magenta – pseudobočno u prvom i drugom stupcu); tsm – biljeg tubularnog segmenta. Mjerna skala = 20 $\mu$ m, odnosi se na sve (povećanje 400 $\times$ ).



Cx37



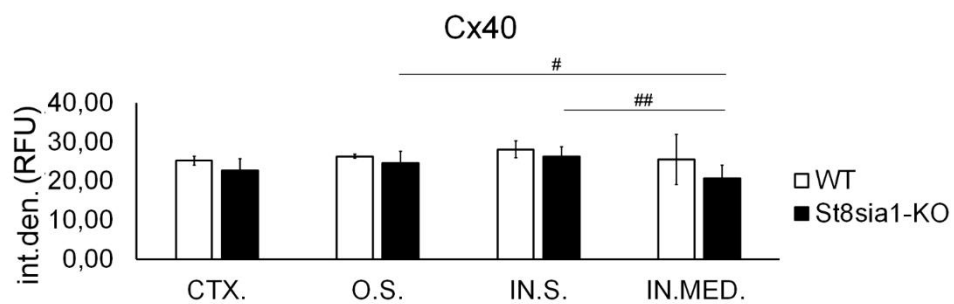
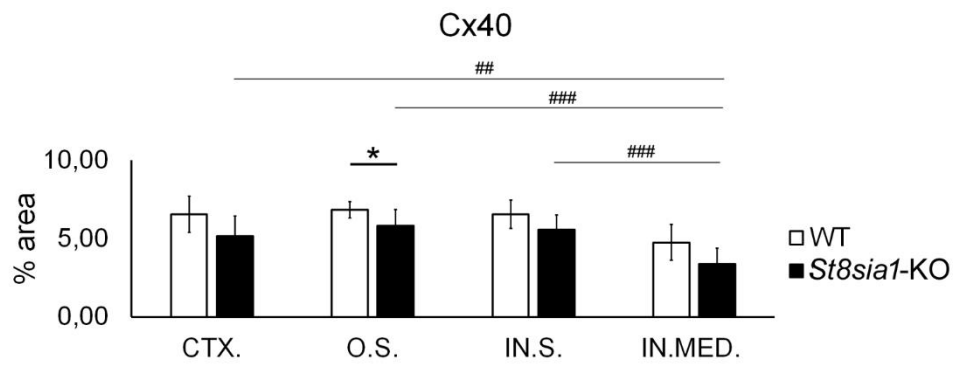
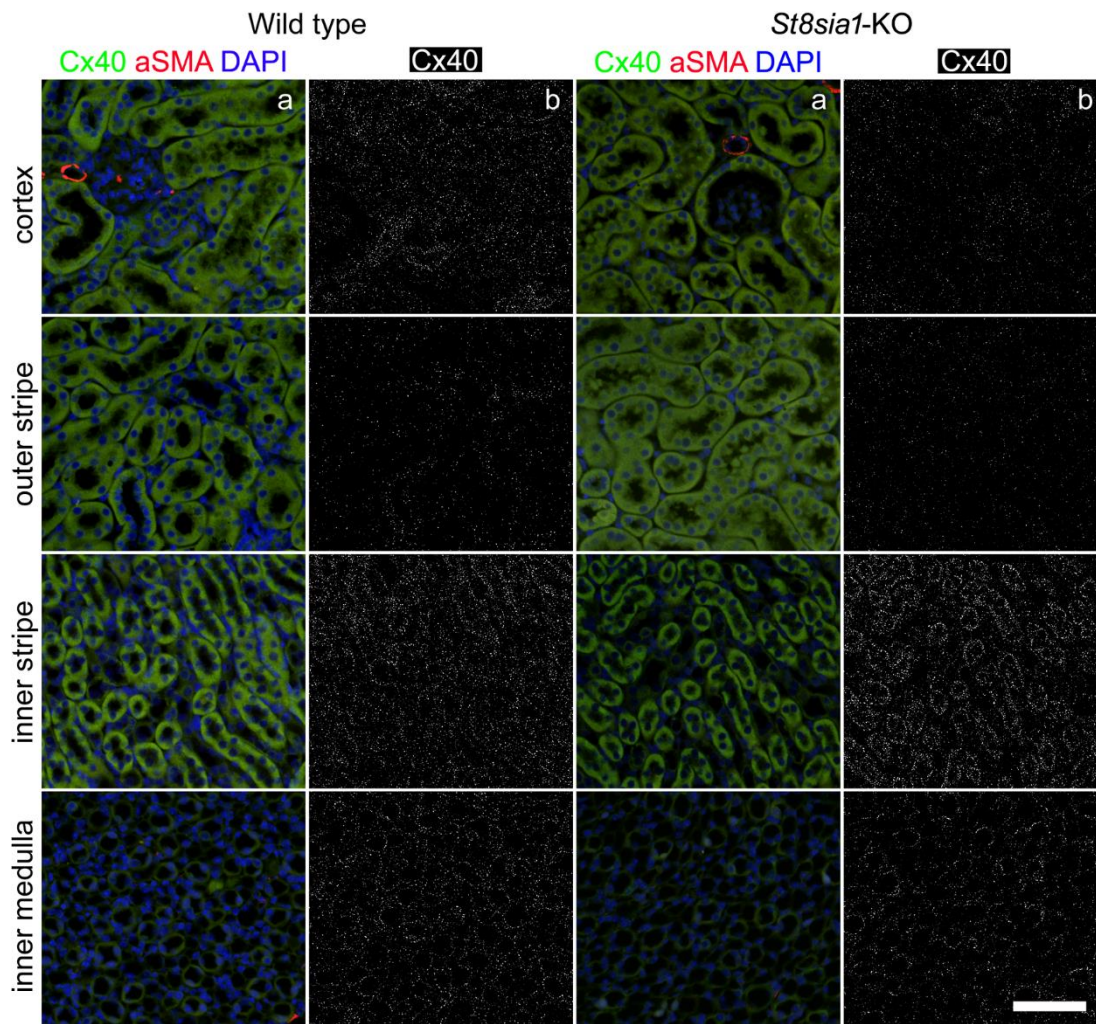
Cx37



**Slika 7.** Izražaj koneksina 37 u različitim dijelovima bubrega miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa. WT - miševi divljeg tipa; *St8sial*-KO – miševi s isključenim *St8sial* genom; CTX. - kora; O.S. – vanjski sloj vanjske medule; IN.S. – unutarnji sloj vanjske medule; IN.MED. - unutarnja medula; % area - postotak površine presjeka prekriven Cx37 imunofluorescencijom; int.den. (RFU) - integrirana gustoća (relativne jedinice za intenzitet fluorescencije). Stupac a - reprezentativne mikrofotografije označenih područja bubrega obojene antitijelima na Cx37 (zeleno) i alfa aktin glatkih mišićnih stanica ( $\alpha$ SMA, crveno); stanične jezgre obojene su plavom bojom. Stupac b - (isti dio kao a) obrađene mikrofotografije s postavljenim graničnim pragom pripremljene za analizu (zamijenjena crna za bijelu na zelenoj slici s postavljenim graničnim pragom). Statistički značajna razlika između WT i *St8sial*-KO: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (t-test za nejednake varijance). Usporedba između različitih područja bubrega u istoj skupini – WT: &  $p < 0,05$ ; &&  $p < 0,01$ ; ili *St8Sial* – #####  $p < 0,0001$  (jednosmjerna ANOVA praćena Tukeyjevim testom za ovisne uzorke). Mjerna skala = 20 $\mu$ m, odnosi se na sve (povećanje 400 $\times$ ).

## 5.2. Izražaj koneksina 40 u bubrezima miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa

Izražaj Cx40 pronađen je u svim tubularnim strukturama u kori i unutarnjoj i vanjskoj meduli bubrega, kao i u glomerulima oba soja miševa, ali imunoreaktivne točkice Cx40 nisu bile tako guste kao imunoreaktivne točkice Cx37 (Slika 8). Izravnu usporedbu treba raditi s oprezom, budući da su korištena dva različita protutijela s različitim svojstvima. Upravo iz tog razloga smo izbjegavali izravnu usporedbu različitih Cx, iako se iz grafičkih prikaza mogu jasno uočiti različite gustoće (15 u odnosu na 5% površine). Najveći izražaj Cx40 pronađen je u LTL-pozitivnim stanicama proksimalnih tubula (PTC) u kori i u AQP1-neimunoreaktivnim stanicama debelog uzlaznog krka Henleove petlje u meduli; također je bio prisutan, ali manje, u DBA-pozitivnim stanicama distalnih tubula (DTC) i AQP1-imunoreaktivnim stanicama tankog silaznog kraka Henleove petlje. Rjeđi, ali različiti točkasti uzorci od Cx37 jasno su pronađeni u AQP2-imunoreaktivnim stanicama sabirnih kanalića (Slika 6). Kvantifikacija je otkrila značajno niži postotak površine prekriven imunofluorescencijom Cx40 ( $p = 0,0489$ ) u O.S. *St8sial*-KO miševa u usporedbi s WT. U WT miševa nije bilo značajne razlike u postotku površine ili I.D. Cx40 među proučavanim dijelovima bubrega. Međutim, kod *St8sial*-KO miševa, najniži postotak površine Cx40 pronađen je u IN.MED. što je značajno niže u usporedbi s CTX. ( $p = 0,0014$ ), O.S. ( $p < 0,0001$ ), i IN.S. ( $p = 0,0002$ ). Cx40 I.D. u IN.MED. je bio značajno niži u usporedbi s O.S. ( $p = 0,0124$ ) i IN.S. ( $p = 0,0012$ ).

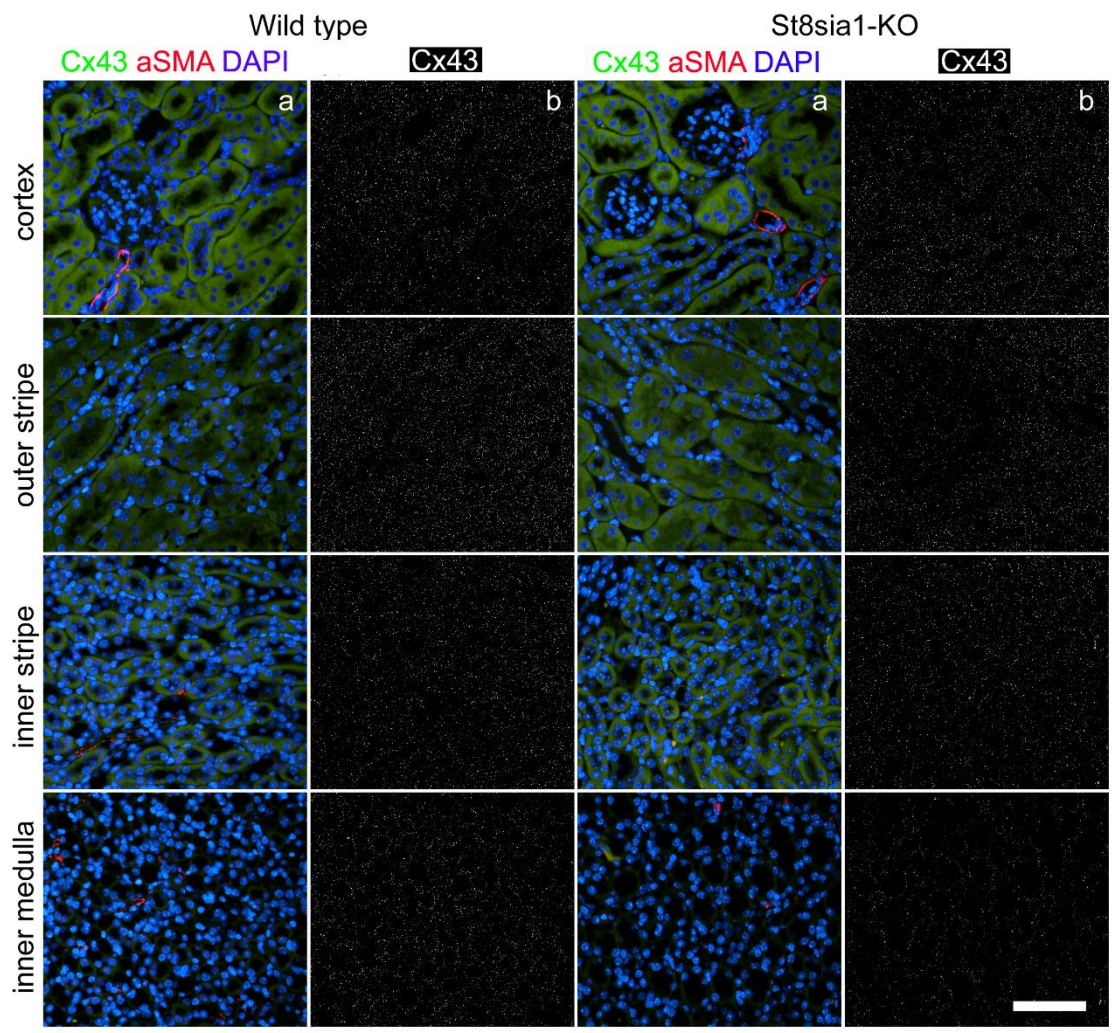


**Slika 8.** Izražaj koneksina 40 u različitim dijelovima bubrega miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa. WT – miševi divljeg tipa; *St8sial*-KO – miševi s isključenim *St8sial* genom; CTX. - kora; O.S. – vanjski sloj vanjske medule; IN.S. – unutarnji sloj vanjske medule; IN.MED. - unutarnja medula; % area – postotak površine presjeka prekriven Cx40 imunofluorescencijom; int.den. (RFU) – integrirana gustoća (relativne jedinice za intenzitet fluorescencije). Stupac a - reprezentativne mikrofotografije označenih područja bubrega obojene antitijelima na Cx40 (zeleno) i alfa aktin glatkih mišićnih stanica ( $\alpha$ SMA, crveno); stanične jezgre obojene su plavom bojom. Stupac b - (isti dio kao a) obrađene mikrofotografije s postavljenim graničnim pragom pripremljene za analizu (zamijenjena crna za bijelu na zelenoj slici s postavljenim graničnim pragom). Statistički značajna razlika između WT i *St8sial*-KO: \*  $p < 0,05$  (t-test za nejednake varijance). Usporedba između različitih područja bubrega u istoj skupini: WT – nije bilo značajne razlike; za *St8Sial* – #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  (jednosmjerna ANOVA praćena Tukeyjevim testom za ovisne uzorke). Mjerna skala = 20 $\mu$ m, odnosi se na sve (povećanje 400 $\times$ ).

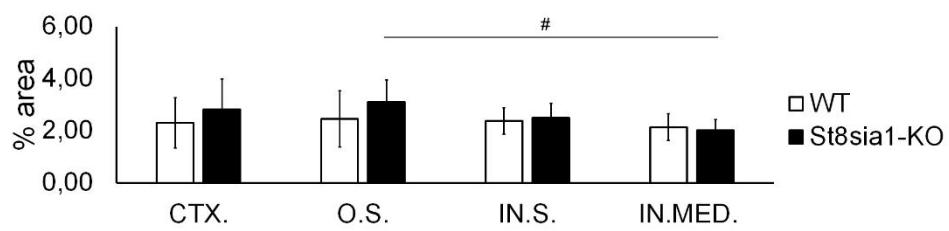
### 5.3. Izražaj koneksina 43 u bubrezima miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa

Iako je Cx43 bio najmanje zastupljen u usporedbi s izražajem svih ostalih koneksina ispitivanih u ovom istraživanju, bio je izražen u većini tubularnih struktura u kori te unutarnjoj i vanjskoj meduli i glomerulima oba soja miševa, ali je bio jedva prisutan u usporedbi sa svim ostalim ispitivanim koneksinima (Slika 9). Dvostrukim imunohistokemijskim bojenjem verificiran je izražaj Cx43 u PTC-ama, DTC-ama i APQ2-imunoreaktivnim stanicama sabirnih kanalića. Najjasnija prisutnost Cx43 pronađena je u AQP1-imunoreaktivnim stanicama tankog silaznog kraka Henleove petlje, dok su za razliku od svih ostalih istraživanih koneksina i Panx1, Cx43-imunoreaktivne točkice bile rijetke (ako ne i odsutne) u AQP1-neimunoreaktivnim stanicama debelog uzlaznog kraka Henleove petlje (Slika 6). Nije bilo značajnih razlika u postotku površine Cx43 ili I.D. između *St8sial*-KO i WT miševa u bilo kojem od ispitivanih područja bubrega. U WT miševa nije bilo značajne razlike u postotku površine Cx43 ili I.D. među istraživanim područjima bubrega. Međutim, kod *St8sial*-KO miševa najniži postotak površine prekriven imunofluorescencijom Cx43 pronađen je u IN.MED. što je značajno niže u usporedbi s O.S. ( $p = 0,01101$ ), ali usporedbom I.D. nije bilo značajne razlike između različitih područja presjeka bubrega.

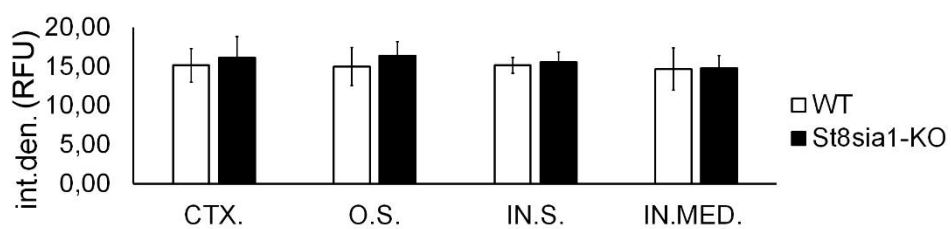




Cx43



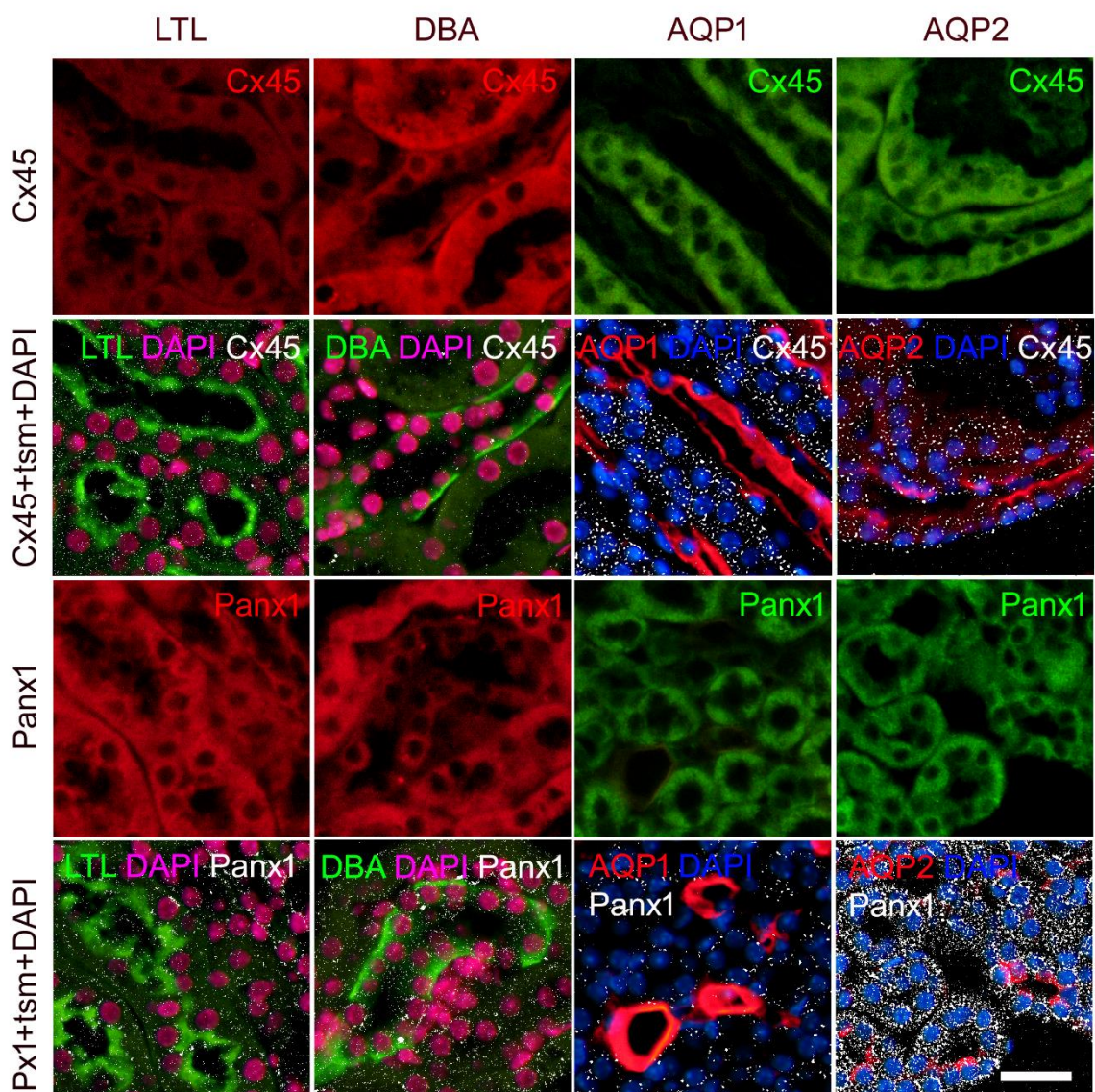
Cx43



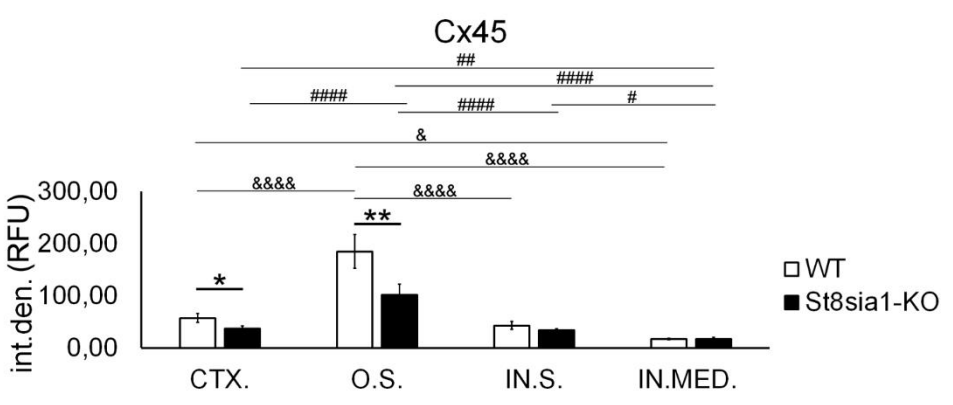
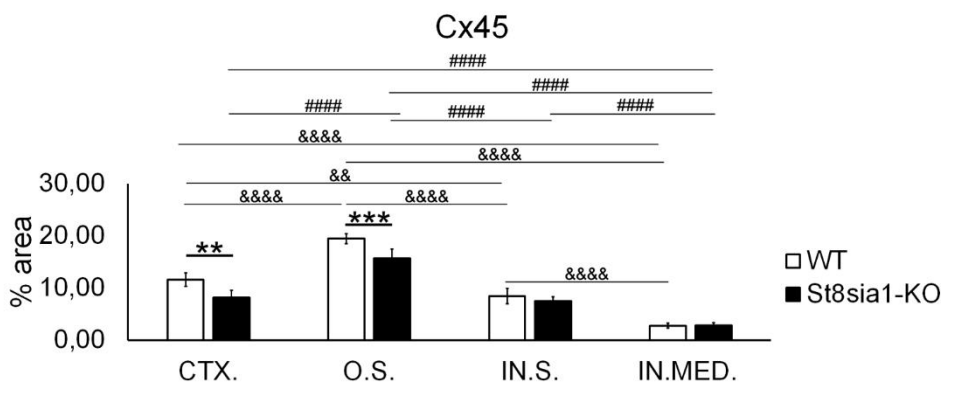
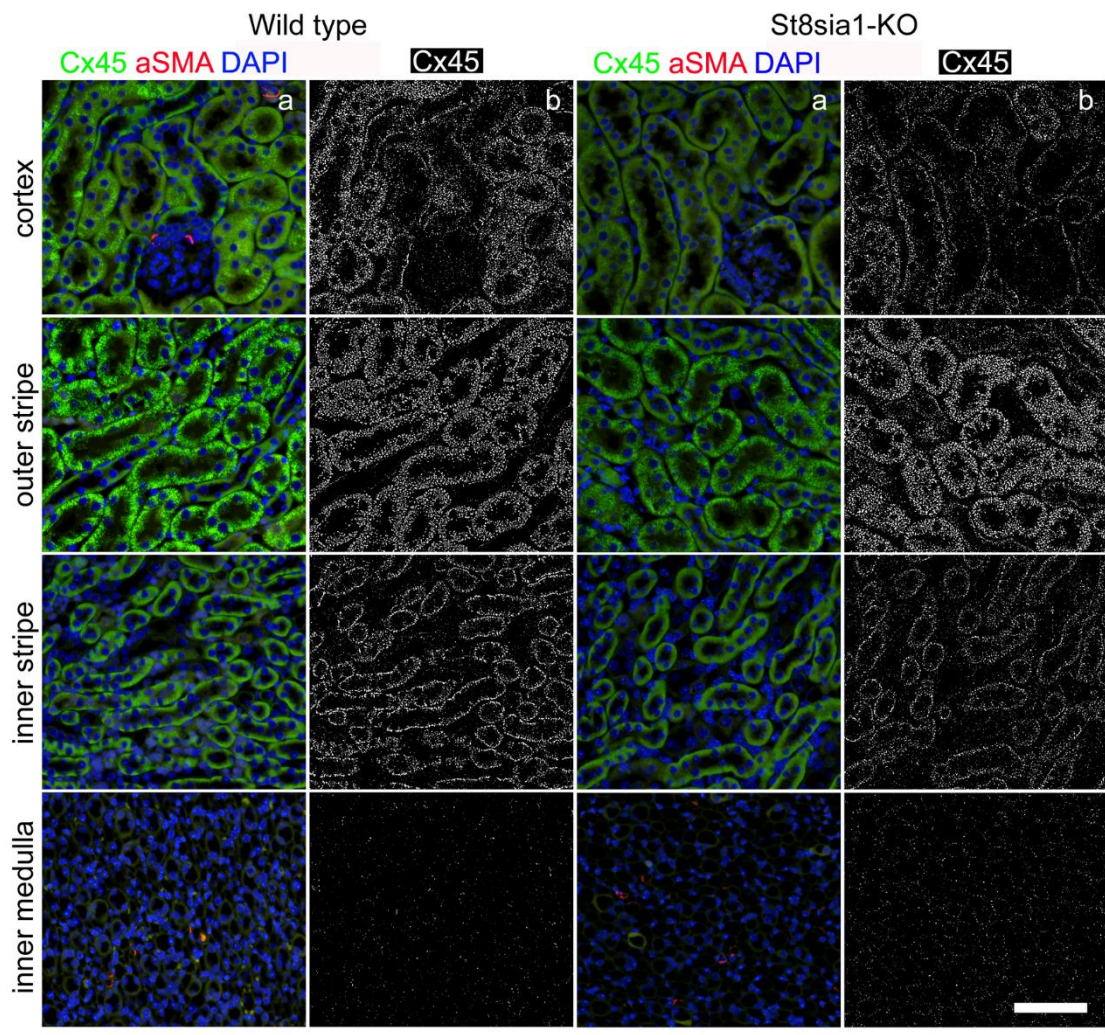
**Slika 9.** Izražaj koneksina 43 u različitim dijelovima bubrega kod miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa. WT – miševi divljeg tipa; *St8sial*-KO – miševi s isključenim *St8sial* genom; CTX. – kora; O.S. – vanjski sloj vanjske medule; IN.S. – unutarnji sloj vanjske medule; IN.MED. - unutarnja medula; % area - postotak površine presjeka prekriven Cx43 imunofluorescencijom; int.den. (RFU) - integrirana gustoća (relativne jedinice za intenzitet fluorescencije). Stupac a - reprezentativne mikrofotografije označenih presjeka bubrega obojenih antitijelima na Cx43 (zeleno) i alfa aktin glatkih mišićnih stanica ( $\alpha$ SMA, crveno); jezgre su obojene plavo. Stupac b - (isti dio kao a) obrađene mikrofotografije s postavljenim graničnim pragom pripremljene za analizu (zamijenjena crna za bijelu na zelenoj slici s postavljenim graničnim pragom). Nije bilo značajne razlike u ekspresiji Cx43 između WT i *St8sial*-KO miševa. Usporedba između različitih područja bubrega u istoj skupini WT – nije bilo značajne razlike; za *St8Sial* – #  $p < 0,05$  (jednosmjerna ANOVA praćena Tukeyjevim testom za ovisne uzorke). Mjerna skala =  $20\mu\text{m}$ , odnosi se na sve (povećanje  $400\times$ ).

#### **5.4. Izražaj koneksina 45 u bubrezima miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa**

Slično izražaju Cx37, Cx45 je obilno izražen u svim tubularnim strukturama u kori te unutarnjoj i vanjskoj meduli. Također je pronađen u glomerulima bubrega oba soja WT i *St8sial*-KO miševa, a čini se da je najgušće izražen u proksimalnim tubulima (Slike 10 i 11). Izražaj Cx45 bio je najveći u meduli – osobito u AQP2-imunoreaktivnim stanicama sabirnih kanalića i AQP1-neimunoreaktivnim stanicama debelog uzlaznog kraka Henleove petlje. Značajno manje izražen je bio u PTC-ama i rijedak u DTC-ama (DBA-pozitivnim) i tankom silaznom kraku Henleove petlje (AQP1-imunoreaktivnim) (Slika 10). Analiza je pokazala značajno niži postotak površine prekrivene Cx45 imunofluorescencijom ( $p = 0,0045$ ) i I.D. ( $p = 0,0114$ ) u CTX; i O.S. (% površine  $p = 0,0007$ ; I.D. -  $P = 0,0082$ ) u *St8sial*-KO miševa, u usporedbi s WT. Postotak površine prekrivene Cx45 imunofluorescencijom i I.D. značajno su varirali između različitih dijelova presjeka bubrega, najviši su bili u O.S., a najniži u IN.MED. ( $p$  od  $0,0151$  do  $p < 0,0001$  u usporedbi s drugim dijelovima presjeka bubrega) i kod WT miševa i kod *St8sial*-KO miševa (Slika 11).



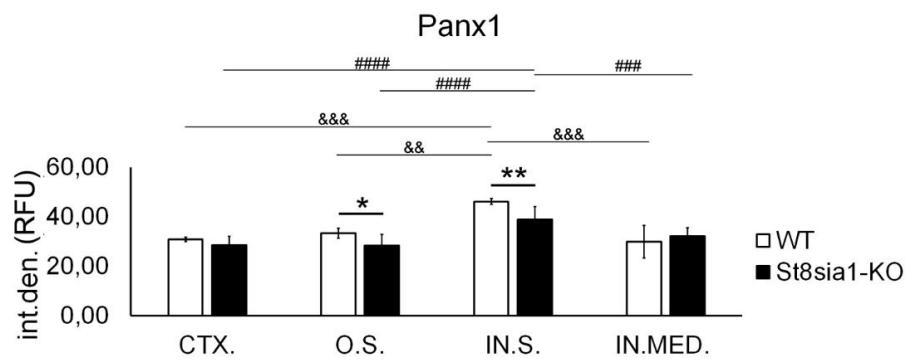
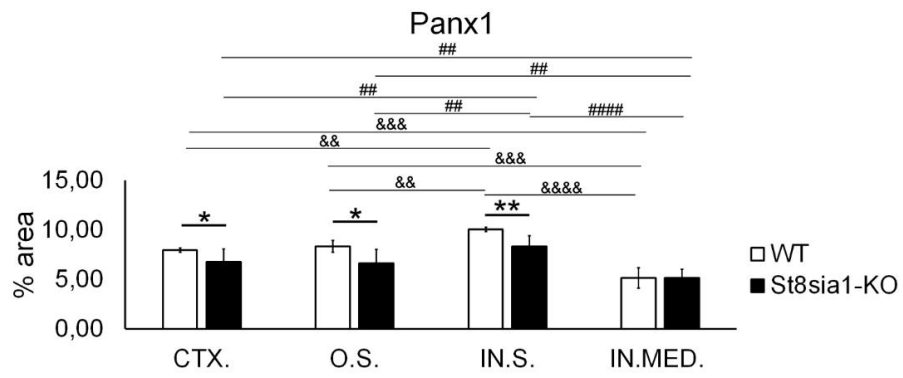
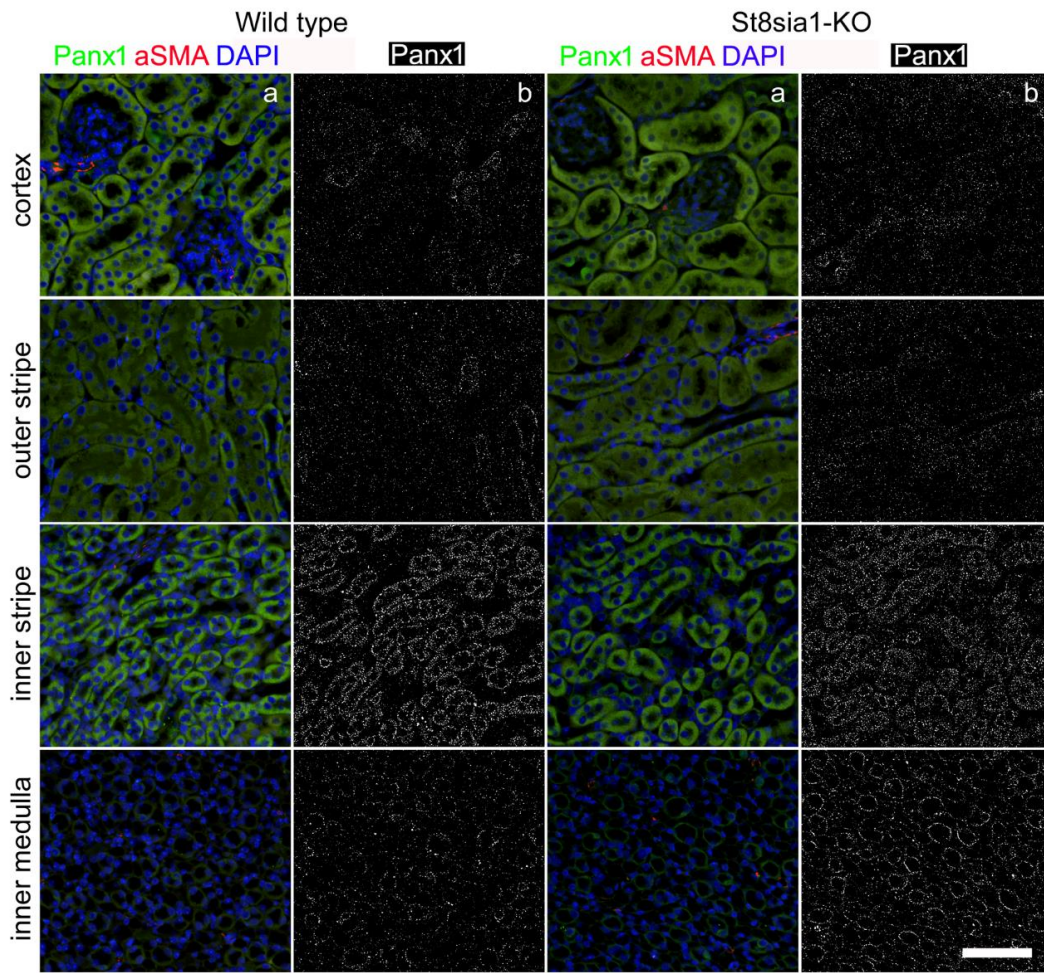
**Slika 10.** Kolokalizacija koneksina 45 i paneksina 1 s različitim biljezima tubularnih segmenata u bubrezima miševa. Rezovi miševa divljeg tipa. *Lotus tetragonolobus* lektin (LTL), biljeg proksimalnih tubula (zeleno; prvi stupac); *Dolichos biflorus* aglutinin (DBA), biljeg distalnih tubula (zeleno; drugi stupac); akvaporin 1 (AQP1), biljeg tankog silaznog kraka Henleove petlje (crveno; treći stupac); akvaporin 2 (AQP2), biljeg sabirnih kanalića (crveno; četvrti stupac). Jezgre su obojene DAPI (plavo u trećem i četvrtom stupcu; magenta – pseudobožno u prvom i drugom stupcu); tsm - biljeg tubularnog segmenta. Mjerna skala = 20 $\mu$ m, odnosi se na sve (povećanje 400 $\times$ ).



**Slika 11.** Izražaj koneksina 45 u različitim dijelovima bubrega kod miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa. WT – miševi divljeg tipa; *St8sial*-KO – miševi s isključenim *St8sial* genom; CTX. – kora; O.S. – vanjski sloj vanjske medule; IN.S. – unutarnji sloj vanjske medule; IN.MED. - unutarnja medula; % area - postotak površine presjeka prekriven Cx45 imunofluorescencijom; int.den. (RFU) - integrirana gustoća (relativne jedinice za intenzitet fluorescencije). Stupac a - reprezentativne mikrofotografije označenih presjeka bubrega obojenih protutijelima na Cx45 (zeleno) i alfa aktin glatkih mišićnih stanica ( $\alpha$ SMA, crveno); jezgre su obojene u plavo. Stupac b - (isti dio kao a) obrađene mikrofotografije s postavljenim graničnim pragom pripremljene za analizu (zamijenjena crna za bijelu na zelenoj slici s postavljenim graničnim pragom). Statistički značajna razlika između WT i *St8sial*-KO: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-test za nejednake varijance). Usporedba između različitih područja bubrega u istoj skupini miševa WT: &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,01$ , &&&  $p < 0,0001$ ; ili *St8sial* – #  $p < 0,05$ . ##  $p < 0,01$ , ####  $p < 0,0001$  (jednosmjerna ANOVA praćena Tukeyjevim testom za ovisne uzorke). Mjerna skala = 20 $\mu$ m, odnosi se na sve (povećanje 400 $\times$ ).

### 5.5. Izražaj paneksina 1 u bubrezima miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa.

Izražaj Panx1 smo pronašli u gotovo svim tubularnim strukturama kore i medule bubrega u oba soja miševa. Međutim, za razliku od Cx, najopsežniji izražaj Panx1 uočen je u IN.S. (Slika 12). Panx1 imunoreaktivnost također je pronađena u glomerulima. Dvostrukim imunohistokemijskim bojenjem pokazano je da je Panx1 bio najizraženiji u AQP2-imunoreaktivnim stanicama sabirnih kanalića te je također bio uočljiv u epitelu debelog uzlaznog kraka Henleove petlje (AQP1-neimunoreaktivne stanice). Bio je rijedak u AQP1-imunoreaktivnom epitelu tankog silaznog kraka Henleove petlje (Slika 10). Značajno niži izražaj Panx1 (% površine –  $p = 0,0394$ ) pronađen je u CTX *St8sial*-KO miševa u usporedbi s WT te u O.S. (% površine –  $p = 0,0144$ ; I.D. –  $p = 0,0245$ ). Najveća razlika pronađena je u IN.S. (% površine –  $p = 0,0028$ ; I.D. –  $p = 0,0048$ ), dok za IN.MED. nije bilo značajne razlike u ekspresiji Panx1 niti bilo kojeg od ispitivanih Cx (Slika 12). Osim toga, izražaj Panx1 značajno je varirao među različitim dijelovima bubrega. Postotak površine prekrivene Panx1 imunofluorescencijom i I.D. bili su najviši u IN.S. i značajno veći u usporedbi sa svim ostalim dijelovima bubrega ( $p$  od 0,0099 do  $p < 0,0001$ ) u WT i *St8sial*-KO miševa. Izražaj Panx1 bio je najniži u IN.MED. – postotak površine prekriven Panx1 imunofluorescencijom je bio značajno niži u usporedbi sa svim ostalim područjima ( $p$  od 0,0040 do  $p < 0,0001$ ), dok je Panx1 I.D. bio značajno niži u IN.MED. u usporedbi s IN.S. u WT ( $p = 0,0005$ ) i *St8sial*-KO miševa ( $p = 0,0008$ ).



**Slika 12.** Izražaj paneksina 1 u različitim dijelovima bubrega miševa divljeg tipa i *St8sial*-KO miševa. WT – miševi divljeg tipa; *St8sial*-KO – miševi s isključenim *St8sial* genom; CTX. – kora; O.S. – vanjski sloj vanjske medule; IN.S. – unutarnji sloj vanjske medule; IN.MED. – unutarnja medula; % area - postotak površine presjeka prekriven Panx1 imunofluorescencijom; int.den. (RFU) - integrirana gustoća (relativne jedinice za intenzitet fluorescencije). Stupac a - reprezentativne mikrofotografije označenih presjeka bubrega obojenih protutijelima na Panx1 (zeleno) i alfa aktin glatkih mišićnih stanica ( $\alpha$ SMA, crveno); jezgre su obojene u plavo. Stupac b - (isti dio kao a) obrađene mikrofotografije s postavljenim graničnim pragom pripremljene za analizu (zamijenjena crna za bijelu na zelenoj slici s postavljenim graničnim pragom). Statistički značajna razlika između WT i *St8sial*-KO: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; (t-test za nejednake varijance). Usporedba između različitih područja bubrega u istoj skupini miševa WT: &&  $p < 0,01$ , &&&  $p < 0,001$ , &&&&  $p < 0,0001$ ; ili *St8Sial* – ##  $p < 0,01$ . ####  $p < 0,001$ , #####  $p < 0,0001$  (jednosmjerna ANOVA praćena Tukeyjevim testom za ovisne uzorke). Mjerna skala =  $20\mu\text{m}$ , odnosi se na sve (povećanje  $400\times$ ).

## **6. RASPRAVA**



U ovom istraživanju smo pronašli imunoreaktivnost svih proučavanih koneksina u većini tubularnih struktura u kori, unutarnjoj i vanjskoj meduli te u glomerulima bubrega i WT i *St8sia1*-KO miševa.

Iako nismo pronašli razliku između različitih dijelova presjeka bubrega u smislu postotka površine prekrivene Cx37 imunofluorescencijom, najveći intenzitet fluorescencije Cx37 pronađen je u IN.MED. IN.MED. bubrega odraslog miša sadrži tanke silazne i tanke uzlazne krakove Henleove petlje, sabirne kanaliće i krvne žile (178). Najjači izražaj Cx37 pronašli smo u tankim silaznim i debelim uzlaznim krakovima Henleove petlje, dok je u sabirnim kanalićima bio rijedak. Snažan intenzitet bojenja Cx37 u IN.MED. proizašao je iz izražaja u epitelu Henleove petlje. Budući da je izražaj Cx37 bio rijedak u sabirnim kanalićima, koji također tvore IN.MED., postotak površine prekriven imunofluorescencijom nije bio veći u usporedbi s drugim dijelovima bubrežnog presjeka. Pronašli smo obilan izražaj Cx37 u glomerulima i epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih tubula, iako manje u usporedbi s izražajem u epitelu Henleove petlje. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim nalazima kod miševa i štakora koji ukazuju na snažan bazolateralni izražaj Cx37 u epitelu debelog uzlaznog kraka Henleove petlje i u distalnom tubulu, dok je izražaj Cx37 bio manji u proksimalnim tubulima i sabirnim kanalićima (33, 81). Tijesni spojevi koje tvore različiti tipovi Cx prisutni su u svim stanicama glomerula (33). Naši se rezultati djelomično slažu s prethodnim studijama koje su pokazale izražaj Cx37 samo u mezangijalnim stanicama vaskularnog glomerularnog pola (33, 91). U prilog tome, nedavna studija na miševima otkrila je mRNA Cx37 u vaskularnom endotelu i stanicama glatkih mišića, u endotelu glomerularnog kapilarnog klupka lokaliziranog oko vaskularnog pola glomerula i u medularnim zrakama (179). Međutim, za razliku od naših rezultata autori prethodno spomenute studije nisu detektirali izražaj mRNA Cx37 ni u jednom tubularnom segmentu (179). Ovi nepodudarni rezultati bi mogli biti posljedica ograničenja tehnike korištene u istraživanju, budući da izražaj mRNA može biti ispod granice detekcije RNAskopa, a i dalje dovoditi do sinteze proteina.

Unatoč snažnom izražaju Cx37 u IN.MED., nije bilo razlike između *St8sia1*-KO miševa i WT miševa u ovom dijelu bubrežnog presjeka. Međutim, izražaj Cx37 bio je niži u CTX. te u O.S. i IN.S. vanjske medule *St8sia1*-KO miševa u usporedbi s WT miševima. Bubrežni CTX. sadrži glomerule, proksimalne i distalne tubule, spojne tubule i sabirne kanaliće. Debeli uzlazni krakovi Henleove petlje i *pars recta* proksimalnih tubula, pored sabirnih kanalića, uglavnom se nalaze u O.S., dok IN.S. sadrži tanke silazne i debele uzlazne krakove Henleove petlje i sabirne kanaliće (178). S obzirom na uočenu raspodjelu Cx37 u različitim tubularnim segmentima, možemo zaključiti da poremećaj sastava gangliozida uzrokovan nedostatkom GD3 sintaze ima najveći utjecaj na ekspresiju/promet Cx37 u proksimalnim i distalnim tubulima i debelim uzlaznim krakovima Henleove petlje.

Izražaj Cx40 u bubrezima je bio manji u odnosu na izražaj Cx37. Pronađen je u glomerulima, DTC-ama i tankom silaznom kraku Henleove petlje. Rjeđe, ali različite točkice Cx40 jasno su verificirane u stanicama sabirnih kanalića. Međutim, Cx40 je bio najobilnije izražen u PTC-ama i stanicama debelog uzlaznog kraka Henleove petlje u meduli. Naš nalaz imunofluorescencije Cx40 u glomerulima u skladu je s prethodnim podacima Hwan Seula i Beyera (89), koji su pronašli obilan izražaj Cx40 u endotelu glomerularnog kapilarnog klupka. Osim toga, Zhang i suradnici (91) su pronašli izražaj Cx40 u mezangijalnim stanicama cijelog glomerularnog područja, iako nisu pronašli Cx40 u glomerularnom endotelu. U skladu s našom studijom, Silverstein i suradnici pronašli su izražaj mRNA Cx40 u proksimalnom i distalnom nefronu koristeći *in situ* RT-PCR, te su otkrili da se izražaj mRNA Cx40 povećao 12 dana nakon jednostrane opstrukcije uretera (eng. *unilateral ureteral obstruction*, UUO) u novorođenih štakora (180). Međutim, za razliku od naših rezultata, mRNA Cx40 nije pronađena u glomerulima štakora u navedenoj studiji (180). U prilog našim rezultatima, Kundu i suradnici također su otkrili povećani glomerularni i tubularni izražaj Cx40 u bubrezima dijabetičnih AKITA miševa (181). Nedavna studija na bubrezima miševa je otkrila izražaj mRNA Cx40 u endotelu krvnih žila (intraglomerularne endotelne stanice na glomerularnom hilusu), glomerulima i medularnim zrakama. Koizražaj mRNA Cx40 i mRNA PDGFR u glomerulima ukazuje na izražaj mRNA Cx40 u mezangijalnim stanicama, ali autori nisu pronašli izražaj mRNA Cx40 ni u jednom tubularnom segmentu. Slično rezultatima ove studije na miševima, rezultati studije iz našeg laboratorija također su pokazali jaki izražaj Cx40 u proksimalnim tubulima štakora (182).

U našem istraživanju nismo pronašli razliku u izražaju Cx40 među proučavanim dijelovima bubrega miševa divljeg tipa (WT). Međutim, najniži postotak površine prekriven Cx40 imunofluorescencijom pronađen je u IN.MED. u *St8sial*-KO miševa. Ova razlika je vjerojatno rezultat smanjenog izražaja u tankim krakovima Henleove petlje, jer smo pronašli svega nekoliko točkica Cx40 u sabirnim kanalićima. Također ne možemo isključiti promjenu izražaja Cx40 u endotelu peritubularnih kapilara u IN.MED. Osim toga, rezultati našeg istraživanja pokazali su da su odsutnost GD3 sintaze i poremećaj sastava gangliozida u *St8sial*-KO miševa rezultirali smanjenim izražajem Cx40 isključivo u O.S. Kao što je ranije spomenuto, O.S. sadrži uglavnom ravne dijelove (S3 segment) proksimalnih tubula i debele uzlazne krakove Henleove petlje, kao i sabirne kanaliće (178). Budući da smo pronašli obilan izražaj Cx40 u proksimalnim tubulima i debelim uzlaznim krakovima Henleove petlje, možemo zaključiti da je izražaj Cx40 u tim dijelovima nefrona najosjetljiviji na promjene u sastavu gangliozida.

Izražaj Cx43 bio je najniži u usporedbi sa svim ostalim ispitivanim koneksinima. U skladu s našim rezultatima, nedavna studija je također otkrila slabiji signal mRNA Cx43 u usporedbi s drugim koneksinima (Cx37, 40 i 45) u bubrezima miša (179). Međutim, izražaj mRNA Cx43 u spomenutoj

studiji je bio ograničen samo na intersticijski kapilarni endotel i autori nisu mogli pronaći izražaj mRNA Cx43 ni u jednom tubularnom segmentu ili glomerularnim stanicama (179). Mi smo pronašli prisutnost Cx43 u glomerulima, PTC-ama, DTC-ama i stanicama sabirnih kanalića. Štoviše, Cx43 je bio najzastupljeniji u tankim silaznim krakovima Henleove petlje, dok su za razliku od svih ostalih Cx i Panx1, Cx43-imunoreaktivne točkice bile rijetke (ako ne i odsutne) u stanicama debelih uzlaznih krakova Henleove petlje. Naši rezultati su u skladu s rezultatima Kundua i suradnika, koji su također otkrili povećan glomerularni i tubularni izražaj Cx43 u bubrezima dijabetičnih AKITA miševa (181). Prethodne studije su pokazale izražaj Cx43 u glomerularnom kapilarnom klupku i u ljudskim podocitima, gdje su oni glavne komponente tijesnih spojeva među podocitima (33, 95). Međutim, u nekim studijama izražaj Cx43 također nije pronađen u glomerulu (91). Što se tiče tubularnog izražaja, podaci su donekle proturječni u pogledu izražaja u medularnim sabirnim kanalićima (33, 91, 183-185). U našoj smo studiji uočili imunoreaktivne točkice Cx43 u kortikalnim i medularnim sabirnim kanalićima. Slično našim i ranije spomenutim rezultatima kod miševa (181), izražaj Cx43 je također je verificiran u proksimalnim tubulima ljudskog bubrega (33, 186, 187). Rezultati naše spomenute studije provedene na štakorima također su potvrdili izražaj Cx43 u proksimalnim tubulima (182). Međutim, kod *St8sial*-KO miševa, najniži postotak površine prekriven Cx43 imunofluorescencijom pronađen je u IN.MED., ali nije bilo razlike u izražaju Cx43 između *St8sial*-KO i WT miševa ni u jednom od ispitivanih područja.

Izražaj Cx45 bio je obilan u glomerulima i tubularnim strukturama u kori i meduli, s najvećom gustoćom u sabirnim kanalićima i debelim uzlaznim krakovima Henleove petlje, nižom u PTC-ama, a rijetkom u DTC-ama i tankim silaznim krakovima Henleove petlje. Naš nalaz Cx45 u glomerulima u skladu je s rezultatima prethodnih studija (33). Pretpostavlja se da je Cx45 izražen u podocitima i mezangijalnim stanicama (92, 188). Podaci o izražaju Cx45 u distalnim tubulima su proturječni, vjerojatno zbog razlika među ispitivanim vrstama (33, 180, 184). Međutim, izražaj Cx45 pronađen je u proksimalnom nefronu bubrega štakora (180). Osim toga, prethodne studije iz našeg laboratorija otkrile su dosljedan izražaj Cx45 u proksimalnim tubulima bubrega miša i štakora (182, 189, 190). Izražaj Cx45 varirao je među različitim dijelovima bubrega, najveći je bio u O.S. vanjske medule, a najmanji u IN.MED., u WT i *St8sial*-KO miševa. Budući da O.S. sadrži uglavnom ravne dijelove proksimalnih tubula i debele uzlazne krakove Henleove petlje (178), to se vjerojatno odražava na nalaz da je najveći izražaj Cx45 pronađen u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje. S druge strane, zbog toga što se IN.MED. sastoji od tankih uzlaznih i silaznih krakova, sabirnih kanalića i peritubularnih kapilara (178), najniža gustoća Cx45 u ovom dijelu bubrega odraz je našeg nalaza da su najrjeđe Cx45-imunoreaktivne točkice pronađene u tankom silaznom kraku Henleove petlje. U *St8sial*-KO miševa, izražaj Cx45 je smanjen u CTX. i O.S. Budući da ova dva područja sadrže

uglavnom proksimalne tubule, možemo pretpostaviti da ovo smanjenje odražava promjenu u ovom segmentu tubula, uz debeli uzlazni krak Henleove petlje u O.S.

U CTX. je imunoreaktivnost Panx1 pronađena u glomerulima, proksimalnim i distalnim tubularnim epitelnim stanicama i sabirnim kanalićima. Za razliku od Cx, najopsežniji izražaj Panx1 pronađen je u IN.S., što odražava najzastupljeniji izražaj u AQP2-imunoreaktivnim stanicama sabirnih kanalića i u epitelu debelog uzlaznog kraka Henleove petlje. Međutim, izražaj Panx1 bio je najniži u IN.MED., što odražava rijetke nalaze u AQP1-imunoreaktivnom epitelu tankog silaznog kraka Henleove petlje. Stanično-specifičnu lokalizaciju izražaja Panx1 u bubrezima miša proučavali su Hanner i suradnici te je u skladu s našim rezultatima, osim Panx1 izražaja u glomerulu, koji oni nisu uspjeli detektirati (121). Druga razlika je u tome što smo pronašli samo rijetke Panx1-imunoreaktivne točkice u AQP1-imunoreaktivnom epitelu tankog silaznog kraka Henleove petlje. Nedostatak GD3 sintaze u *St8sial1*-KO miševa i posljedični poremećaj sastava gangliozida rezultirali su nižim izražajem Panx1 u CTX. i O.S. bubrega, što vjerojatno odražava smanjenje u proksimalnim tubulima i sabirnim kanalićima. Međutim, najveće smanjenje izražaja Panx1 uočeno je u IN.S., što vjerojatno odražava smanjenje u sabirnim kanalićima i debelom uzlaznom kraku Henleove petlje.

Kao važna komponenta međustanične signalizacije, Panx1 je uključen u parakrinu signalizaciju preko oslobađanja ATP-a iz stanica kroz kanale sastavljene od Panx1 (113, 191, 192). Uključen je u nekoliko metaboličkih poremećaja i doprinosi patofiziologiji šećerne bolesti tipa 2, budući da njegov povećan izražaj u masnom tkivu korelira sa stupnjem inzulinske rezistencije (98, 193, 194). Također je utvrđeno da Panx1 regulira oslobađanje kemoatraktanata za fagocitne stanice tijekom apoptoze, dok za aktivaciju inflammasoma nije neophodan (195). Smatra se da Panx1 kanali igraju važnu ulogu u regulaciji transporta soli i vode u bubrežnim tubulima, a time i homeostaze tjelesnih tekućina, zbog svoje sposobnosti da reguliraju oslobađanje ATP-a u lumen tubula i bubrežnu vaskulaturu (121). Promijenjen sastav gangliozida koji mijenja izražaj Panx1 može utjecati na višestruke funkcije koje Panx1 ima u bubrezima.

U ovom istraživanju smo koristili miševe kojima nedostaje enzim GD3 sintaza kao model za istraživanje mogućih promjena u izražaju Cx i Panx1 zbog specifično promijenjenog sastava gangliozida. *St8sial1*-KO miševi imaju manjak gangliozida b-serije (GD3, GD1b, GT1b) i c-serije (GT3, GT2, GT1c), a akumuliraju gangliozide a-serije (GM1, GM2, GM3 i GD1a). Kao što je ranije spomenuto, koneksinski kanali su u staničnoj membrani povezani s lipidnim splavima i kaveolama. Raspodjela koneksinskih kanala u splavima i njihova funkcija ovise o lipidnom sastavu i specifičnim biofizičkim svojstvima splavi (38, 39, 42-45). Stoga je za očekivati promjene u izražaju, distribuciji i prometu Cx u lipidnom mikrokolišu s poremećenim sastavom gangliozida i svojstvima lipidnih splavi. Prema našim rezultatima, izražaj Cx37, Cx40, Cx45 i Panx1 je smanjen u različitim dijelovima

bubrega *St8sial*-KO miševa u usporedbi s WT. Najdosljednije smanjenje pronađeno je u O.S., gdje je izražaj svih biljega (Cx 37, 40, 45 i Panx1) poremećen u *St8sial*-KO miševa; u CTX. je pronađeno smanjenje izražaja Cx37, Cx45 i Panx1, dok je u IN.S. smanjen izražaj Cx37 i Panx1.

Kratki životni vijek Cx uključuje njihovo kotranslacijsko umetanje u ER (gdje neki od novosintetiziranih Cx podliježu degradaciji povezanoj s ER), transport do stanične membrane paralelno s oligomerizacijom do koneksiona, alternativno spajanje na koneksone susjednih stanica, ili postojanje kao hemikanali. Osim toga, endocitozom mogu oblikovati koneksosome, koji se razgrađuju autofagijom, ili se mogu reciklirati pomoću endosomalne mašinerije (196). Stoga bi prekid bilo kojeg koraka u tim procesima mogao dovesti do izmijenjene dinamike stanične sinteze i degradacije Cx, što bi zauzvrat rezultiralo izmijenjenim profilom Cx. Promjene u izražaju Cx koje smo pronašli u promijenjenom gangliozidnom mikrookruženju bubrega *St8sial*-KO miša mogle bi se barem djelomično objasniti prethodno dokazanim utjecajem gangliozidnog profila na autofagiju. Autofagija je bitan homeostatski proces kojim stanice razgrađuju i recikliraju nepotrebne ili nefunkcionalne komponente i organele, osiguravajući stanici značajne izvore energije. Poremećena autofagija može dovesti do nakupljanja sfingolipida i doprinosi patogenezi nekih bolesti (197-199). Garofalo i suradnici su izvijestili o važnoj ulozi GD3 gangliozida, paradigmatičke komponente lipidnih splavi, u formiranju autofagosoma kroz međusobnu komunikaciju mitohondrija i ER u ranim fazama procesa autofagije. U njihovom eksperimentu, nedostatak *St8sial* gena rezultirao je ometanjem nukleacije autofagosoma (138). Stoga, promijenjeni sastav gangliozida kod *St8sial*-KO miševa može dovesti do poremećaja autofagije kroz promjene u sastavu lipidnih splavi.

S druge strane, pokazalo se da je razgradnja kanala GJ posredovana grupiranjem Cx43 u mikrodomenama lipidnih splavi u kumulus-oocita kompleksima (COC) (200). Stoga bi se moglo očekivati da bi promjena u sastavu lipidnih splavi mogla dovesti do smanjene degradacije GJ (i Cx). Iako su Panx proteini podvrgnuti sličnim putevima sinteze, ER obrade i sastavljanja heksamera, te proteasomske razgradnje krivo savijenih Panx proteina, za razliku od Cx, oni imaju dulji poluživot i ne koriste klasičnu endocitotsku mašineriju (103, 119, 201, 202). Međutim, razgradnja internaliziranih Panx je lizosomski ovisna (202). Stoga, promjena u izražaju Panx1 koju smo pronašli kod *St8sial*-KO miševa također može biti povezana s mogućim poremećajem sinteze, prometa i razgradnje Panx1.

Najzastupljeniji bubrežni gangliozid GM3 zajedno s drugim gangliozidom a-serije GM1 tvori lipidne splavi, a u njihovoj stabilnosti i formiranju sfingolipidi imaju važnu ulogu (154, 203). Kod *St8sial*-KO miševa nakupljaju se gangliozidi a-serije (147), te je neizbježno da se sastav gangliozida u lipidnim splavima mijenja. Lipidne splavi djeluju kao platforme koje koordiniraju putove prijenosa signala u stanicama. Koneksini su prvenstveno lokalizirani u lipidnim splavima, koje mogu utjecati

na njihovu preraspodjelu između koneksoonskih hemikanala plazma membrane i GJ plakova. Nedavni dokazi pokazuju da se distribucija Cx kanala razlikuje u splavima s različitim lipidnim sastavom te da specifična biofizička svojstva splavi mogu utjecati na funkciju Cx kanala (45). To bi moglo objasniti različite "odgovore" različitih Cx u bubregu na isključenje *Stδsial* gena, uočene u našoj studiji. Primjerice, razina Cx43 nije se promijenila u bubrezima *Stδsial*-KO miševa u usporedbi s WT, a poznato je da su Cx43 prvenstveno kaveolarni Cx koji su netopivi u Tritonu X-100 (43, 204). Regulacija funkcije Cx lipidnim splavima također je očita u progresiji tumora, gdje sudjelovanje Cx u migraciji/invaziji stanica ovisi o lokalizaciji kanala u lipidnim splavima kao što su kaveole (46). Naši su podaci u skladu s prethodnim prijedlozima da su lipidne splavi ključni igrači u dinamičkoj preraspodjeli i ravnoteži Cx između GJ plakova i hemikanala plazma membrane, te da različite lipidne splavi također mogu biti uključene u njihov unutarstanični promet (45).

Glavno ograničenje našeg istraživanja bilo je to što smo koristili samo imunohistokemiju kao metodu za kvantificiranje različitih Cx u dva soja miševa. Međutim, fluorescencijska mikroskopija osim fluorescencije kvantificira i prostornu informaciju o distribuciji proteina u tkivu ili stanici. Potonje je ključno u našim rezultatima, jer smo također željeli otkriti distribuciju proteina u različitim područjima bubrega (CTX., O.S. i IN.S. i IN.MED.) te različitim strukturama bubrega, stoga je imunohistokemija, koja omogućuje otkrivanje prostorne distribucije, odabrana kao najadekvatnija metoda. Iako western blot i qRT-PCR omogućuju kvantifikaciju proteina/genskih proizvoda, gubi se prostorna rezolucija, što je bilo od velike važnosti u našem istraživanju.

### **6.1. Značenje rezultata istraživanja na animalnom modelu za humanu dijabetičku nefropatiju i hipertenziju**

Šećerna bolest je globalni zdravstveni problem koji pogađa gotovo 10% odraslih, a očekuje se da će prevalencija porasti na 783 milijuna ljudi u svijetu do 2045. godine (205). Karakterizirana je povišenom razinom glukoze u krvi i kroničnom upalom koja prethodi nastanku višestrukih sekundarnih komplikacija te je vodeći uzrok završnog stadija bubrežne bolesti i sljepoće u radnoj populaciji (206). Komplikacije šećerne bolesti se dijele na makrovaskularne, koje uključuju moždani udar (207), koronarnu arterijsku bolest (208) i perifernu arterijsku bolest (209) te mikrovaskularne komplikacije koje uključuju retinopatiju (210, 211), nefropatiju (212, 213) i usporeno cijeljenje rana (214). Komplikacije nastaju kao odgovor na dugotrajnu hiperglikemiju i sistemsku upalu niskog stupnja (206). Pokazano je da hiperglikemija uz IFN- $\gamma$  (u proupalnim uvjetima) djeluje na endotelne hemikanale koje tvori Cx43 povećavajući njihovu aktivnost, uzrokujući tako oštećenje i disfunkciju endotelnih stanica (215). Od svih izoformi Cx, upravo je Cx43 snažno povezan s patogeneom višestrukih sekundarnih komplikacija dijabetesa (216-219). Zbog toga su lijekovi koji ciljaju

hemikanale Cx43 identificirani kao potencijalni protuupalni lijekovi (220, 221). Kronična upala je obilježje dijabetičke retinopatije (222) i nefropatije (223), a upravo blokiranje Cx43 hemikanala se u najnovijoj literaturi opisuje kao efektivna ciljana terapija za liječenje upale u sekundarnim komplikacijama bubrega i oka u šećernoj bolesti (206). Blokatori koneksinskih hemikanala predstavljaju obećavajuće buduće terapijske opcije u liječenju nefropatije i retinopatije, a kako bi se odredila djelotvornost i dugoročna korist od ovih lijekova potrebna su daljnja istraživanja (206). Promjene Cx kod ljudi istraživane su i kao prognostički biljezi progresije dijabetičke nefropatije. Primjerice, promjena izražaja Cx43 u podocitima je usko povezana s napredovanjem dijabetičke nefropatije, te bi izražaj Cx43 mogao biti prikladan način za predviđanje pogoršanja bubrežne funkcije (95). Koneksini imaju važnu ulogu u pravilnoj funkciji većine organa ključnih za regulaciju razine glukoze u krvi i arterijskog tlaka, što implicira da promjenom međustanične komunikacije ključnih stanica ili nekog drugog puta u ovim organima, defekti koneksina mogu pridonijeti abnormalnim međuorganskim interakcijama koje se opažaju u svim oblicima dijabetesa i metaboličkog sindroma (224).

U bubrezima *St8sial1*-KO miševa dolazi do nakupljanja gangliozida a-serije, i nedostatka gangliozida b- i c-serije. AGE koji su povišeni u šećernoj bolesti, uključeni su u razvoj mikrovaskularnih komplikacija, uključujući dijabetičku retinopatiju i dijabetičku nefropatiju. Pokazano je da uzrokuju inhibiciju proliferacije retinalnih pericita goveda i mezangijskih stanica bubrega štakora, što je barem djelomično povezano s porastom gangliozida a-serije, posljedično povećanju aktivnosti GM3 sintaze i smanjenju aktivnosti GD3 sintaze (160). Čini se da upravo gangliozidi a-serije posreduju štetne učinke AGE na ove stanice, te mogu predstavljati zajednički mehanizam uključen u stanične promjene koje se javljaju tijekom razvoja dijabetičke retinopatije i dijabetičke nefropatije (160).

Osim u šećernoj bolesti, čini se da signalizacija putem Cx ima središnju ulogu u kontroli tonusa krvnih žila i arterijskog tlaka (225). Tako funkcioniranje sustava renin-angiotenzin ovisi o signalizaciji posredovanoj Cx40 (224). Ovaj Cx povezuje stanice koje luče renin, a koje u kori bubrega tvore jukstaglomerularni dijelovi aferentne arteriole. Miševi kojima nedostaje Cx40 su kronično hipertenzivni zbog pojačane aktivacije renin-angiotenzin sustava (226). Vaskularna komponenta hipertenzije izazvana nedostatkom Cx40 vjerojatno nastaje kao posljedica prekida međustanične komunikacije između različitih stanica JGA (226). Polimorfizam promotora gena za Cx40 u ljudi je povezan s povećanim rizikom od hipertenzije kod muškaraca (227).

Slijedom svega navedenog, izmijenjen sastav gangliozida u bubrezima *St8sial1*-KO miševa može biti dobar model za proučavanje posljedičnih promjena izražaja Cx u dijabetičkim uvjetima. Iako miševi korišteni u ovom istraživanju nisu imali dijabetes, promjene gangliozidnog sastava

imitiraju dijabetičke uvjete te se posljedične promjene u izražaju koneksina i paneksina mogu tumačiti u tom kontekstu. Navedeni model za proučavanje je iznimno važan i u razvoju lijekova koji djeluju na upalni odgovor bez ozbiljnih nuspojava, za što je potrebno puno detaljnih informacija o događajima na staničnoj razini (220). Također, razina funkcionalnih tijesnih spojeva koje čine Cx samim starenjem se mijenja, što zahtjeva pažljivo razmatranje svih lijekova koji bi djelovali na razinu Cx, a za to je važno poznavati događaje na staničnoj razini (220), čemu svakako doprinose rezultati našeg istraživanja.



## **7. ZAKLJUČCI**

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da nedostatak GD3 sintaze kod *St8sial1*-KO miševa dovodi do poremećaja bubrežnog izražaja koneksina što je vjerojatno povezano s promjenom sastava gangliozida. Promjena nije uočena za sve ispitivane tipove koneksina u različitim dijelovima bubrega koji su proučavani. Naši podaci u skladu su s prethodno opisanom ulogom lipidnih splavi u distribuciji i transportu koneksina. Opaženi poremećaj izražaja koneksina u bubrezima *St8sial1*-KO miševa može biti jedan od mehanizama nastanka prethodno utvrđenog iscrpljivanja funkcionalnog bubrežnog parenhima koje je uzrokovano akumulacijom GM3 u hiperglikemijskim uvjetima.

## **8. SAŽETAK**

U miševa s isključenim *St8sial* genom (*St8sial*-KO), kojima nedostaje enzim GD3 sintaza, nakupljaju se gangliozidi a-serije, a nedostaju gangliozidi b- i c-serije. Iako se sastav gangliozida značajno mijenja, ukupna koncentracija gangliozida u KO miševa ostaje ista kao u miševa divljeg tipa (WT). Gangliozidi u staničnoj membrani nisu uniformno raspoređeni, nego su grupirani u lipidnim splavima, kao i transmembranski proteini koneksini (Cx), koji su ključni za međustaničnu komunikaciju u mnogim organima, a u nekoliko regulatornih mehanizama u bubrezima igraju funkcionalnu ulogu. S obzirom na to da promijenjeni sastav gangliozida utječe na distribuciju proteina u lipidnim splavima različitih staničnih membrana i tako vjerojatno utječe na distribuciju, transport i funkciju različitih izoformi Cx, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinke promijenjenog sastava gangliozida na izražaj Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 u različitim regijama bubrega *St8sial*-KO miševa. Pokusi su provedeni na dvanaest mužjaka miševa u dobi od 6 mjeseci: četiri miša divljeg tipa (C57BL/6-tip, WT) i osam *St8sial*-KO miševa. Uzorci mišjih bubrega su obrađeni za imunohistokemiju i potom analizirani. Izražaj Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Panx1 ispitivan je imunofluorescentnim mikroskopom (BX61, Olympus, Tokio, Japan), dok je kvantitativna procjena imunoreaktivnosti provedena pomoću ImageJ softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Kako bi lokalizirali izražaj koneksina i Panx1 u različitim dijelovima bubrega miša, uradili smo dvostruko imunohistokemijsko bojenje s različitim biljezima tubularnih segmenata. Izražaj koneksina i Panx1 je određen u različitim regijama bubrega: kora (CTX.), vanjski sloj vanjske medule (O.S.), unutarnji sloj vanjske medule (IN.S.) i unutarnja medula (IN.MED. ). Cx37, Cx40, Cx45 i Panx1 značajno su niže izraženi u različitim dijelovima bubrega *St8sial*-KO miševa u usporedbi s WT. Svi ovi ranije navedeni koneksini smanjenog su izražaja najkonzistentnije u O.S. u *St8sial*-KO miševa, pa možemo zaključiti da su proksimalni tubuli i debeli uzlazni krakovi Henleove petlje dijelovi nefrona koji su najosjetljiviji na promjene u sastavu gangliozida. U CTX. regiji je zabilježen smanjen izražaj Cx37, Cx45 i Panx1, dok su u IN.S. regiji Cx37 i Panx1 bili smanjeno izraženi. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da nedostatak GD3 sintaze u *St8sial*-KO miševa dovodi do poremećaja izražaja Cx u bubrezima, što je vjerojatno povezano s promjenom sastava gangliozida. Uočeni poremećaj izražaja Cx u bubrezima *St8sial*-KO miševa daje važan uvid u promjene na staničnoj razini koje se mogu vidjeti u hiperglikemijskim stanjima, a time i vrijedne informacije za buduća istraživanja. Izmijenjen sastav gangliozida u bubrezima *St8sial*-KO miševa može biti dobar model za proučavanje posljedičnih promjena izražaja Cx u dijabetičkim uvjetima.

## **9. SUMMARY**

In *St8sial1* gene knockout mice (*St8sial1*-KO) lacking the GD3 synthase enzyme, a-series gangliosides accumulate, and b- and c-series gangliosides are deficient. Total concentration of gangliosides in the KO mice remains the same as in wild-type (WT) mice, while the ganglioside composition markedly changes. In the plasma membrane gangliosides are clustered in lipid rafts, same as connexins (Cx), that are transmembrane proteins critical for intercellular communication in many organs, and play a functional role in several regulatory mechanisms in kidney. Considering that altered ganglioside composition affects the distribution of proteins in lipid rafts of different cell membranes and in this way probably influences the distribution, transport, and function of different Cx isoforms, the aim of this study was to determine the effects of altered ganglioside composition on the expression of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, and Panx1 in different kidney regions of *St8sial1*-KO mice. Experiments were performed in twelve male 6-month-old mice: four wild-type (C57BL/6-type, WT) and eight *St8sial1*-KO mice. Mice kidney samples were processed for immunohistochemistry and analyzed. The expression of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 and Panx1 was examined by immunofluorescence microscopy (BX61, Olympus, Tokio, Japan), while quantitative evaluation of immunoreactivity was performed using ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). To localize expression of connexins and Panx1 in different parts of the mice kidney, we performed double fluorescent staining with different tubular segment markers. The expression of connexins and Panx1 was determined in different regions of the kidney: cortex (CTX.), outer stripe of outer medulla (O.S.), inner stripe of outer medulla (IN.S.), and inner medulla (IN.MED.). Cx37, Cx40, Cx45, and Panx1 are significantly lower expressed in different parts of the kidneys of *St8sial1*-KO mice compared with WT. All of the above mentioned markers are decreased the most consistent in the O.S. in *St8sial1*-KO mice, so we can conclude that proximal tubules and thick ascending limbs are parts of the nephron most sensitive to changes in ganglioside composition. In the CTX. region reduced expression for Cx37, Cx45 and Panx1 was observed, while in the IN.S. region Cx37 and Panx1 were lower expressed. The results of the present study suggest that deficiency of GD3 synthase in *St8sial1*-KO mice leads to disturbance in renal Cx expression, which is probably related to alteration of ganglioside composition. The observed disruption of Cx expression in the kidney of *St8sial1*-KO mice gives important insight in changes on cellular level that can be seen in hyperglycemic conditions, and thus valuable informations for future studies. The disruption of ganglioside composition in the kidney of *St8sial1*-KO mice may be a good model for the alteration of ganglioside composition and properties of lipid rafts under diabetic conditions.

## **10. LITERATURA**

1. Fanghanel J, Anderhuber F, Pera F. Waldeyerova anatomija čovjeka. 17th ed. Vinter I, editor. Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga; 2009.
2. El-Reshaid W, Abdul-Fattah H. Sonographic assessment of renal size in healthy adults. *Med Princ Pract*. 2014;23(5):432-6.
3. Sampaio FJ. Renal anatomy. Endourologic considerations. *Urol Clin North Am*. 2000;27(4):585-607.
4. Coffin A, Boulay-Coletta I, Sebbag-Sfez D, Zins M. Radioanatomy of the retroperitoneal space. *Diagn Interv Imaging*. 2015;96(2):171-86.
5. Tirkes T, Sandrasegaran K, Patel AA, Hollar MA, Tejada JG, Tann M, et al. Peritoneal and retroperitoneal anatomy and its relevance for cross-sectional imaging. *Radiographics*. 2012;32(2):437-51.
6. Megha R, Wehrle CJ, Kashyap S, et al. Anatomy, abdomen and pelvis, adrenal glands (Suprarenal Glands). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [Cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482264/>
7. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. 2nd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
8. Zhang JL, Rusinek H, Chandarana H, Lee VS. Functional MRI of the kidneys. *J Magn Reson Imaging*. 2013;37(2):282-93.
9. Junqueira LC, Carneiro H. Mokraćni sustav. In: Junqueira LC, Carneiro H, editors. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005. p. 383-401.
10. Brown AL. The structure of the nephron. *Med Clin North Am*. 1966;50(4):927-35.
11. Lowe JS, Anderson PG. Urinary system. In: Lowe JS, Anderson PG, editors. Stevens & Lowe's human histology. Fourth ed. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby; 2015.
12. Kirkpatrick JJ, Foutz S, Leslie SW. Anatomy, abdomen and pelvis, kidney nerves. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [Cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459339/>
13. McMahon RS, Penfold D, Bashir K. Anatomy, abdomen and pelvis, kidney collecting ducts. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [Cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549766/>
14. McCormick JA, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Compr Physiol*. 2015;5(1):45-98.
15. Wang X, Garrett MR. Nephron number, hypertension, and CKD: physiological and genetic insight from humans and animal models. *Physiol Genomics*. 2017;49(3):180-92.
16. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(8):1461-9.
17. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J*. 1998;68(5):800, 803-16, 819-20; quiz 821-4.
18. Bell PD, Lapointe JY, Peti-Peterdi J. Macula densa cell signaling. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:481-500.



19. Goligorsky MS, Iijima K, Krivenko Y, Tsukahara H, Hu Y, Moore LC. Role of mesangial cells in macula densa to afferent arteriole information transfer. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(7):527-31.
20. Madrazo-Ibarra A, Vaitla P. Histology, Nephron. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [Cited 2022 Oct 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554411/>
21. Scott RP, Quaggin SE. Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209(2):199-210.
22. Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(9):1627-38.
23. Dantzler WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL. Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(10):1781-9.
24. Mount DB. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(11):1974-86.
25. Subramanya AR, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(12):2147-63.
26. Sebastian A, Hulter HN, Kurtz I, Maher T, Schambelan M. Disorders of distal nephron function. *Am J Med*. 1982;72(2):289-307.
27. Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PM, Kohan DE. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(1):135-46.
28. Radi ZA. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. *Int J Toxicol*. 2019;38(3):215-27.
29. Treuting PM, Kowalewska J. Urinary system. In: Treuting PM, Dinitzs SM, editors. *Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas*. Oxford: Academic Press Elsevier; 2012. p. 229-51.
30. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1359-400.
31. Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, Ponsaerts R, D'Hondt C, Bultynck G, et al. Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815(1):13-25.
32. Yao J, Oite T, Kitamura M. Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(5):F939-46.
33. 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.
34. Wright JA, Richards T, Becker DL. Connexins and diabetes. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:496904.
35. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1719(1-2):6-23.
36. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*. 2006;394(Pt 3):527-43.

37. Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol.* 2002;19(2):121-36.
38. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387(6633):569-72.
39. Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Tajima O, Furukawa K. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem Res.* 2012;37(6):1185-91.
40. Garofalo T, Giammarioli AM, Misasi R, Tinari A, Manganelli V, Gambardella L, et al. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ.* 2005;12(11):1378-89.
41. Danielsen EM, Hansen GH. Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells. *Mol Membr Biol.* 2006;23(1):71-9.
42. Lin D, Zhou J, Zelenka PS, Takemoto DJ. Protein kinase Cgamma regulation of gap junction activity through caveolin-1-containing lipid rafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(12):5259-68.
43. Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry.* 2002;41(18):5754-64.
44. Bathori G, Cervenak L, Karadi I. Caveolae--an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2004;21(2):67-95.
45. Locke D, Liu J, Harris AL. Lipid rafts prepared by different methods contain different connexin channels, but gap junctions are not lipid rafts. *Biochemistry.* 2005;44(39):13027-42.
46. Defamie N, Mesnil M. The modulation of gap-junctional intercellular communication by lipid rafts. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):1866-9.
47. Delvaeye T, Vandenabeele P, Bultynck G, Leybaert L, Krysko DV. Therapeutic targeting of connexin channels: new views and challenges. *Trends Mol Med.* 2018;24(12):1036-53.
48. Tittarelli A. Connexin channels modulation in pathophysiology and treatment of immune and inflammatory disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021;1867(12):166258.
49. Van Campenhout R, Gomes AR, De Groof TWM, Muyldermans S, Devoogdt N, Vinken M. Mechanisms underlying connexin hemichannel activation in disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3503.
50. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J.* 2006;397(1):1-14.
51. Meunier C, Wang N, Yi C, Dallerac G, Ezan P, Koulakoff A, et al. Contribution of astroglial Cx43 hemichannels to the modulation of glutamatergic currents by d-serine in the mouse prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2017;37(37):9064-75.
52. Peng B, Xu C, Wang S, Zhang Y, Li W. The role of connexin hemichannels in inflammatory diseases. *Biology (Basel).* 2022;11(2):237.
53. Wang N, De Vuyst E, Ponsaerts R, Boengler K, Palacios-Prado N, Wauman J, et al. Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(1):309.

54. Tarzemany R, Jiang G, Jiang JX, Larjava H, Hakkinen L. Connexin 43 hemichannels regulate the expression of wound healing-associated genes in human gingival fibroblasts. *Sci Rep*. 2017;7(1):14157.
55. Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Hurd YL, Condorelli DF. Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene. *J Neurosci Res*. 1999;57(5):740-52.
56. Wang N, De Bock M, Decrock E, Bol M, Gadicherla A, Vinken M, et al. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(1):35-50.
57. 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.
58. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:475-502.
59. Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem*. 2003;10(19):2045-58.
60. Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, et al. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell Death Differ*. 2009;16(4):524-36.
61. Unwin PN, Ennis PD. Two configurations of a channel-forming membrane protein. *Nature*. 1984;307(5952):609-13.
62. Vinken M, De Rop E, Decrock E, De Vuyst E, Leybaert L, Vanhaecke T, et al. Epigenetic regulation of gap junctional intercellular communication: more than a way to keep cells quiet? *Biochim Biophys Acta*. 2009;1795(1):53-61.
63. Vinken M, Doktorova T, Decrock E, Leybaert L, Vanhaecke T, Rogiers V. Gap junctional intercellular communication as a target for liver toxicity and carcinogenicity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009;44(4):201-22.
64. Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*. 2010;46(1):1-12.
65. Moreno AP, Lau AF. Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;94(1-2):107-19.
66. Segretain D, Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1662(1-2):3-21.
67. Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(1):118-33.
68. Common JE, O'Toole EA, Leigh IM, Thomas A, Griffiths WA, Venning V, et al. Clinical and genetic heterogeneity of erythrokeratoderma variabilis. *J Invest Dermatol*. 2005;125(5):920-7.
69. Dekel N, Lawrence TS, Gilula NB, Beers WH. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol*. 1981;86(2):356-62.
70. Sohl G, Odermatt B, Maxeiner S, Degen J, Willecke K. New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;47(1-3):245-59.

71. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 1995;267(5205):1831-4.
72. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*. 1997;385(6616):525-9.
73. Retamal MA, Reyes EP, Garcia IE, Pinto B, Martinez AD, Gonzalez C. Diseases associated with leaky hemichannels. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:267.
74. Srinivas M, Verselis VK, White TW. Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018;1860(1):192-201.
75. Loewenstein WR, Rose B. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol*. 1992;3(1):59-79.
76. Trosko JE, Chang CC, Wilson MR, Upham B, Hayashi T, Wade M. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods*. 2000;20(2):245-64.
77. Meda P. The role of gap junction membrane channels in secretion and hormonal action. *J Bioenerg Biomembr*. 1996;28(4):369-77.
78. Zhang JT, Nicholson BJ. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J Cell Biol*. 1989;109(6 Pt 2):3391-401.
79. Sainio K, Gilbert SF, Lehtonen E, Nishi M, Kumar NM, Gilula NB, et al. Differential expression of gap junction mRNAs and proteins in the developing murine kidney and in experimentally induced nephric mesenchymes. *Development*. 1992;115(3):827-37.
80. Hanner F, Schnichels M, Zheng-Fischhofer Q, Yang LE, Toma I, Willecke K, et al. Connexin 30.3 is expressed in the kidney but not regulated by dietary salt or high blood pressure. *Cell Commun Adhes*. 2008;15(1):219-30.
81. Stoessel A, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Connexin 37 is localized in renal epithelia and responds to changes in dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(1):F216-23.
82. McCulloch F, Chambrey R, Eladari D, Peti-Peterdi J. Localization of connexin 30 in the luminal membrane of cells in the distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(6):F1304-12.
83. Kurtz A. Renal connexins and blood pressure. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(8):1903-8.
84. Kuhn K, Reale E. Junctional complexes of the tubular cells in the human kidney as revealed with freeze-fracture. *Cell Tissue Res*. 1975;160(2):193-205.
85. Taugner R, Kirchheim H, Forssmann WG. Myoendothelial contacts in glomerular arterioles and in renal interlobular arteries of rat, mouse and *Tupaia belangeri*. *Cell Tissue Res*. 1984;235(2):319-25.
86. Taugner R, Schiller A, Kaissling B, Kriz W. Gap junctional coupling between the JGA and the glomerular tuft. *Cell Tissue Res*. 1978;186(2):279-85.
87. Mink D, Schiller A, Kriz W, Taugner R. Interendothelial junctions in kidney vessels. *Cell Tissue Res*. 1984;236(3):567-76.

88. Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen T, Holstein-Rathlou NH. Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochem Cell Biol*. 2001;115(6):479-87.
89. Hwan Seul K, Beyer EC. Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvasc Res*. 2000;59(1):140-8.
90. Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Connexin expression in renin-producing cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):506-12.
91. Zhang J, Hill CE. Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. *Kidney Int*. 2005;68(3):1171-85.
92. Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Kruger O, et al. 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.
93. Kurt B, Kurtz L, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Willecke K, Wagner C, et al. Reciprocal expression of connexin 40 and 45 during phenotypical changes in renin-secreting cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(3):F743-8.
94. Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney KR, Hill CE, et al. Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney Int*. 2008;73(4):415-22.
95. Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Yoshioka T, et al. 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.
96. Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(20):7655-9.
97. Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. *Mol Biol Cell*. 2009;20(20):4313-23.
98. Adamson SE, Meher AK, Chiu YH, Sandilos JK, Oberholtzer NP, Walker NN, et al. Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Mol Metab*. 2015;4(9):610-8.
99. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. 2004;83(4):706-16.
100. Lohman AW, Billaud M, Straub AC, Johnstone SR, Best AK, Lee M, et al. Expression of pannexin isoforms in the systemic murine arterial network. *J Vasc Res*. 2012;49(5):405-16.
101. Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2007;282(43):31733-43.
102. Dahl G, Locovei S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life*. 2006;58(7):409-19.
103. Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, et al. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 21):3772-83.

104. Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, et al. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 2009;284(27):18143-51.
105. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 2004;572(1-3):65-8.
106. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature.* 2010;467(7317):863-7.
107. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 2006;580(1):239-44.
108. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 2006;25(21):5071-82.
109. Reigada D, Lu W, Zhang M, Mitchell CH. Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels. *Neuroscience.* 2008;157(2):396-404.
110. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal.* 2008;1(39):ra6.
111. Qiu F, Dahl G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(2):C250-5.
112. Wang J, Ma M, Locovei S, Keane RW, Dahl G. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(3):C1112-9.
113. Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:103-14.
114. Dando R, Roper SD. Cell-to-cell communication in intact taste buds through ATP signalling from pannexin 1 gap junction hemichannels. *J Physiol.* 2009;587(Pt 24):5899-906.
115. Dahl G. ATP release through pannexon channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1672):20140191.
116. Sandilos JK, Bayliss DA. Physiological mechanisms for the modulation of pannexin 1 channel activity. *J Physiol.* 2012;590(24):6257-66.
117. Billaud M, Sandilos JK, Isakson BE. Pannexin 1 in the regulation of vascular tone. *Trends Cardiovasc Med.* 2012;22(3):68-72.
118. Sridharan M, Adderley SP, Bowles EA, Egan TM, Stephenson AH, Ellsworth ML, et al. Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(4):H1146-52.
119. Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(1):15-22.

120. Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, et al. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2011;208(9):1823-34.
121. Hanner F, Lam L, Nguyen MT, Yu A, Peti-Peterdi J. Intrarenal localization of the plasma membrane ATP channel pannexin1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(10):F1454-9.
122. Li G, Zhang Q, Hong J, Ritter JK, Li PL. Inhibition of pannexin-1 channel activity by adiponectin in podocytes: Role of acid ceramidase activation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(10):1246-56.
123. Jelacic I, Vukojevic K, Racetin A, Caric D, Glavina Durdov M, Saraga-Babic M, et al. Expression of pannexin 1 in the human kidney during embryonal, early fetal and postnatal development and its prognostic significance in diabetic nephropathy. *Biomedicines*. 2022;10(5):944.
124. DeLalio LJ, Masati E, Mendu S, Ruddiman CA, Yang Y, Johnstone SR, et al. Pannexin 1 channels in renin-expressing cells influence renin secretion and blood pressure homeostasis. *Kidney Int*. 2020;98(3):630-44.
125. Groux-Degroote S, Guerardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, biosynthesis, analysis, and roles in cancer. *Chembiochem*. 2017;18(13):1146-54.
126. Savas B, Astarita G, Aureli M, Sahali D, Ollero M. Gangliosides in Podocyte Biology and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9645.
127. Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem*. 1963;10:613-23.
128. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci*. 2011;60(10):537-44.
129. The LipidWeb [Internet]. LipidMaps; 2022 [Cited 2022 Dec 1]. Available from: [https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb\\_html/lipids/sphingo/gang/index.htm](https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/sphingo/gang/index.htm)
130. Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(5):549-57.
131. Glebov OO, Nichols BJ. Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat Cell Biol*. 2004;6(3):238-43.
132. Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res*. 2004;45(5):783-93.
133. Sturgill ER, Aoki K, Lopez PH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, et al. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology*. 2012;22(10):1289-301.
134. Ishii A, Ikeda T, Hitoshi S, Fujimoto I, Torii T, Sakuma K, et al. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology*. 2007;17(3):261-76.
135. Mlinac K, Fon Tacer K, Heffer M, Rozman D, Bogнар SK. Cholesterogenic genes expression in brain and liver of ganglioside-deficient mice. *Mol Cell Biochem*. 2012;369(1-2):127-33.
136. Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2005;280(16):16227-34.

137. Matarrese P, Garofalo T, Manganelli V, Gambardella L, Marconi M, Grasso M, et al. Evidence for the involvement of GD3 ganglioside in autophagosome formation and maturation. *Autophagy*. 2014;10(5):750-65.
138. Garofalo T, Matarrese P, Manganelli V, Marconi M, Tinari A, Gambardella L, et al. Evidence for the involvement of lipid rafts localized at the ER-mitochondria associated membranes in autophagosome formation. *Autophagy*. 2016;12(6):917-35.
139. Groux-Degroote S, Rodriguez-Walker M, Dewald JH, Daniotti JL, Delannoy P. Gangliosides in cancer cell signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;156:197-227.
140. Nordstrom V, Willershauser M, Herzer S, Rozman J, von Bohlen Und Halbach O, Meldner S, et al. Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central nervous system regulates body weight and energy homeostasis. *PLoS Biol*. 2013;11(3):e1001506.
141. Ji S, Tokizane K, Ohkawa Y, Ohmi Y, Banno R, Okajima T, et al. Increased a-series gangliosides positively regulate leptin/Ob receptor-mediated signals in hypothalamus of GD3 synthase-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(3):453-60.
142. Inamori KI, Ito H, Tamura Y, Nitta T, Yang X, Nihei W, et al. Deficient ganglioside synthesis restores responsiveness to leptin and melanocortin signaling in obese KKAY mice. *J Lipid Res*. 2018;59(8):1472-81.
143. Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SI. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):18987-91.
144. Coskun U, Grzybek M, Drechsel D, Simons K. Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9044-8.
145. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, et al. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13678-83.
146. Nagafuku M, Sato T, Sato S, Shimizu K, Taira T, Inokuchi J. Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. *Glycobiology*. 2015;25(3):303-18.
147. Okada M, Itoh Mi M, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, et al. b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1633-6.
148. Husain S, Yildirim-Toruner C, Rubio JP, Field J, Schwalb M, Cook S, et al. Variants of ST8SIA1 are associated with risk of developing multiple sclerosis. *PLoS One*. 2008;3(7):e2653.
149. Nara K, Watanabe Y, Kawashima I, Tai T, Nagai Y, Sanai Y. Acceptor substrate specificity of a cloned GD3 synthase that catalyzes the biosynthesis of both GD3 and GD1c/GT1a/GQ1b. *Eur J Biochem*. 1996;238(3):647-52.
150. Nakayama J, Fukuda MN, Hirabayashi Y, Kanamori A, Sasaki K, Nishi T, et al. Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme. *J Biol Chem*. 1996;271(7):3684-91.
151. Liu J, Zheng X, Pang X, Li L, Wang J, Yang C, et al. Ganglioside GD3 synthase (GD3S), a novel cancer drug target. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(5):713-20.



152. Hu X, Yang Y, Wang Y, Ren S, Li X. Identifying an immune-related gene ST8SIA1 as a novel target in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Front Pharmacol.* 2022;13:901518.
153. Prokazova NV, Samovilova NN, Gracheva EV, Golovanova NK. Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry (Mosc).* 2009;74(3):235-49.
154. Saito M, Sugiyama K. Gangliosides in rat kidney: composition, distribution, and developmental changes. *Arch Biochem Biophys.* 2001;386(1):11-6.
155. Kaneko T, Tsubakihara Y, Fushimi H, Yamaguchi S, Takabatake Y, Rakugi H, et al. Histochemical and immunoelectron microscopic analysis of ganglioside GM3 in human kidney. *Clin Exp Nephrol.* 2015;19(3):403-10.
156. Jin J, Sison K, Li C, Tian R, Wnuk M, Sung HK, et al. Soluble FLT1 binds lipid microdomains in podocytes to control cell morphology and glomerular barrier function. *Cell.* 2012;151(2):384-99.
157. Vukovic I, Bozic J, Markotic A, Ljubcic S, Ticinovic Kurir T. The missing link - likely pathogenetic role of GM3 and other gangliosides in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(3):306-14.
158. Andrews PM. Glomerular epithelial alterations resulting from sialic acid surface coat removal. *Kidney Int.* 1979;15(4):376-85.
159. Fox TE, Kester M. Therapeutic strategies for diabetes and complications: a role for sphingolipids? *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:206-16.
160. Masson E, Troncy L, Ruggiero D, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S. a-Series gangliosides mediate the effects of advanced glycation end products on pericyte and mesangial cell proliferation: a common mediator for retinal and renal microangiopathy? *Diabetes.* 2005;54(1):220-7.
161. Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3085-92.
162. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, et al. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3445-9.
163. Novak A, Rezic Muzinic N, Cikes Culic V, Bozic J, Ticinovic Kurir T, Ferhatovic L, et al. Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of types 1 and 2 diabetes. *J Physiol Biochem.* 2013;69(4):727-35.
164. Handa Y, Ozaki N, Honda T, Furukawa K, Tomita Y, Inoue M, et al. GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. *Pain.* 2005;117(3):271-9.
165. Ji S, Ohkawa Y, Tokizane K, Ohmi Y, Banno R, Furukawa K, et al. b-Series gangliosides crucially regulate leptin secretion in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459(2):189-95.
166. Hamamura K, Furukawa K, Hayashi T, Hattori T, Nakano J, Nakashima H, et al. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11041-6.

167. Shibuya H, Hamamura K, Hotta H, Matsumoto Y, Nishida Y, Hattori H, et al. Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci.* 2012;103(9):1656-64.
168. Furukawa K, Hamamura K, Ohkawa Y, Ohmi Y. Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj J.* 2012;29(8-9):579-84.
169. Ruckhaberle E, Karn T, Rody A, Hanker L, Gatje R, Metzler D, et al. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(8):1005-13.
170. Lo Piccolo MS, Cheung NK, Cheung IY. GD2 synthase: a new molecular marker for detecting neuroblastoma. *Cancer.* 2001;92(4):924-31.
171. Furukawa K, Horie M, Okutomi K, Sugano S. Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1627(2-3):71-8.
172. Kang NY, Kim CH, Kim KS, Ko JH, Lee JH, Jeong YK, et al. Expression of the human CMP-NeuAc:GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene through the NF-kappaB activation in human melanoma SK-MEL-2 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1769(11-12):622-30.
173. Dae HM, Kwon HY, Kang NY, Song NR, Kim KS, Kim CH, et al. Isolation and functional analysis of the human glioblastoma-specific promoter region of the human GD3 synthase (hST8Sia I) gene. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2009;41(3):237-45.
174. Bobowski M, Vincent A, Steenackers A, Colomb F, Van Seuning I, Julien S, et al. Estradiol represses the G(D3) synthase gene ST8SIA1 expression in human breast cancer cells by preventing NFκB binding to ST8SIA1 promoter. *PLoS One.* 2013;8(4):e62559.
175. Groux-Degroote S, Delannoy P. Cancer-Associated Glycosphingolipids as Tumor Markers and Targets for Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):6145.
176. Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, Okada M, Okumura K, Hayakawa T, et al. Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29881-8.
177. Yo S, Hamamura K, Mishima Y, Hamajima K, Mori H, Furukawa K, et al. Deficiency of GD3 Synthase in Mice Resulting in the Attenuation of Bone Loss with Aging. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2825.
178. Kumaran GK, Hanukoglu I. Identification and classification of epithelial cells in nephron segments by actin cytoskeleton patterns. *FEBS J.* 2020;287(6):1176-94.
179. Geis L, Boudriot FF, Wagner C. Connexin mRNA distribution in adult mouse kidneys. *Pflugers Arch.* 2021;473(11):1737-47.
180. Silverstein DM, Thornhill BA, Leung JC, Vehaskari VM, Craver RD, Trachtman HA, et al. Expression of connexins in the normal and obstructed developing kidney. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(3):216-24.
181. Kundu S, Pushpakumar SB, Tyagi A, Coley D, Sen U. Hydrogen sulfide deficiency and diabetic renal remodeling: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(12):E1365-78.

182. Luetic M, Vitlov Uljevic M, Masek T, Benzon B, Vukojevic K, Filipovic N. PUFAs supplementation affects the renal expression of pannexin 1 and connexins in diabetic kidney of rats. *Histochem Cell Biol.* 2020;153(3):165-75.
183. Barajas L, Liu L, Tucker M. Localization of connexin43 in rat kidney. *Kidney Int.* 1994;46(3):621-6.
184. Butterweck A, Gergs U, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells. *J Membr Biol.* 1994;141(3):247-56.
185. Guo R, Liu L, Barajas L. RT-PCR study of the distribution of connexin 43 mRNA in the glomerulus and renal tubular segments. *Am J Physiol.* 1998;275(2):R439-47.
186. Vergara L, Bao X, Bello-Reuss E, Reuss L. Do connexin 43 gap-junctional hemichannels activate and cause cell damage during ATP depletion of renal-tubule cells? *Acta Physiol Scand.* 2003;179(1):33-8.
187. Vergara L, Bao X, Cooper M, Bello-Reuss E, Reuss L. Gap-junctional hemichannels are activated by ATP depletion in human renal proximal tubule cells. *J Membr Biol.* 2003;196(3):173-84.
188. Just A, Kurtz L, de Wit C, Wagner C, Kurtz A, Arendshorst WJ. Connexin 40 mediates the tubuloglomerular feedback contribution to renal blood flow autoregulation. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1577-85.
189. Lozic M, Filipovic N, Juric M, Kosovic I, Benzon B, Solic I, et al. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and Renin Expression Patterns in Postnatal Kidneys of Dab1<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1284.
190. Luetic M, Kretzschmar G, Grobe M, Jercic L, Bota I, Ivic V, et al. 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.
191. Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M. Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41(5):525-34.
192. Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol.* 2007;3(3):199-208.
193. 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.
194. Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2017;180:144-60.
195. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE, et al. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol.* 2011;186(11):6553-61.
196. Aasen T, Leithe E, Graham SV, Kameritsch P, Mayan MD, Mesnil M, et al. Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene.* 2019;38(23):4429-51.

197. Alexaki A, Gupta SD, Majumder S, Kono M, Tuymetova G, Harmon JM, et al. Autophagy regulates sphingolipid levels in the liver. *J Lipid Res.* 2014;55(12):2521-31.
198. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2013;19(8):983-97.
199. Nixon RA, Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis.* 2011;43(1):38-45.
200. Sasseville M, Gagnon MC, Guillemette C, Sullivan R, Gilchrist RB, Richard FJ. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Mol Endocrinol.* 2009;23(5):700-10.
201. Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G. Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. *Cell Commun Adhes.* 2008;15(1):119-32.
202. Gehi R, Shao Q, Laird DW. Pathways regulating the trafficking and turnover of pannexin1 protein and the role of the C-terminal domain. *J Biol Chem.* 2011;286(31):27639-53.
203. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004;5(8):777-82.
204. O'Connell KM, Martens JR, Tamkun MM. Localization of ion channels to lipid Raft domains within the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(2):37-42.
205. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
206. Cliff CL, Williams BM, Chadjichristos CE, Mouritzen U, Squires PE, Hills CE. Connexin 43: A target for the treatment of inflammation in secondary complications of the kidney and eye in diabetes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):600.
207. Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Al Suwaidi J, Abi Khalil C. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7839101.
208. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17(1):83.
209. Soyoye DO, Abiodun OO, Ikem RT, Kolawole BA, Akintomide AO. Diabetes and peripheral artery disease: A review. *World J Diabetes.* 2021;12(6):827-38.
210. Wang W, Lo ACY. Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1816.
211. Sabanayagam C, Banu R, Chee ML, Lee R, Wang YX, Tan G, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(2):140-9.
212. Chen Y, Lee K, Ni Z, He JC. Diabetic kidney disease: challenges, advances, and opportunities. *Kidney Dis (Basel).* 2020;6(4):215-25.
213. Zoja C, Xinaris C, Macconi D. Diabetic Nephropathy: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Front Pharmacol.* 2020;11:586892.

214. Lan CC, Wu CS, Huang SM, Wu IH, Chen GS. High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing. *Diabetes*. 2013;62(7):2530-8.
215. Saez JC, Contreras-Duarte S, Labra VC, Santibanez CA, Mellado LA, Inostroza CA, et al. Interferon-gamma and high glucose-induced opening of Cx43 hemichannels causes endothelial cell dysfunction and damage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(8):118720.
216. Zhang Q, Wu S, Sun G, Zhang R, Li X, Zhang Y, et al. Hyperglycemia aggravates monocyte-endothelial adhesion in human umbilical vein endothelial cells from women with gestational diabetes mellitus by inducing Cx43 overexpression. *Ann Transl Med*. 2021;9(3):234.
217. Lyon H, Shome A, Rupenthal ID, Green CR, Mugisho OO. Tonabersat Inhibits Connexin43 Hemichannel Opening and Inflammasome Activation in an In Vitro Retinal Epithelial Cell Model of Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):298.
218. Kim SR, Kwon SH. Podocytes and microRNA-30/Cx43 axis in diabetic nephropathy. *Ann Transl Med*. 2021;9(10):828.
219. Thakur V, Alcoreza N, Cazares J, Chattopadhyay M. Changes in stress-mediated markers in a human cardiomyocyte cell line under hyperglycemia. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10802.
220. Laird DW, Lampe PD. Therapeutic strategies targeting connexins. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(12):905-21.
221. Rhett JM, Yeh ES. The potential for connexin hemichannels to drive breast cancer progression through regulation of the inflammatory response. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1043.
222. Raman KS, Matsubara JA. Dysregulation of the NLRP3 inflammasome in diabetic retinopathy and potential therapeutic targets. *Ocul Immunol Inflamm*. 2022;30(2):470-8.
223. Moreno JA, Gomez-Guerrero C, Mas S, Sanz AB, Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, et al. Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(11):917-30.
224. Hamelin R, Allagnat F, Haefliger JA, Meda P. Connexins, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Protein Pept Sci*. 2009;10(1):18-29.
225. Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension*. 2006;48(5):804-11.
226. Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert JF, Caille D, Nicod P, et al. Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int*. 2007;72(7):814-22.
227. Firouzi M, Kok B, Spiering W, Busjahn A, Bezzina CR, Ruijter JM, et al. Polymorphisms in human connexin40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men. *J Hypertens*. 2006;24(2):325-30.

## **11. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODATCI**

**Ime i prezime:** Diana Meter (r. Bajo), dr. med.

**Datum i mjesto rođenja:** 02.01.1992., Metković, Hrvatska

**Adresa:** Dinka Šimunovića 20, 21000 Split

**Elektronička pošta:** dianabajo53@gmail.com

**Državljanstvo:** hrvatsko

## **IZOBRAZBA**

09/1998 – 05/2006	<b>Osnovna škola Stjepana Radića Metković, Metković, Hrvatska</b>
09/2000 – 05/2006	<b>Osnovna glazbena škola Metković, glasovir, Metković, Hrvatska</b>
09/2006 – 05/2010	<b>Prirodoslovno-matematička gimnazija, Metković, Hrvatska</b>
10/2010 – 06/2016	<b>Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Medicina, Split, Hrvatska</b>
04/2018 – Trenutačno	<b>Specijalizacija iz Alergologije i kliničke imunologije, Klinički bolnički centar Split, Split, Hrvatska</b>
10/2019 – Trenutačno	<b>Doktorski studij Biologija novotvorina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska</b>

## **NAGRADE I PRIZNANJA**

2017	<b>Dekanova nagrada za izvrstan uspjeh tijekom studija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska</b>
------	---

## **RADNO ISKUSTVO**

08/11/2016 – 07/04/2017	<b>Pripravnički staž, Klinički bolnički centar Split, Split, Hrvatska</b>
14/06/2017 – 27/01/2018	<b>Doktorica opće medicine, Obiteljska medicina Split, Hrvatska</b>

09/02/2018 – 17/04/2018 **Doktorica u Timu 1 hitne medicinske pomoći**, Zavod za hitnu medicinu Zadarske županije, Kali, Hrvatska

23/04/2018 – Trenutačno **Doktorica medicine na specijalizaciji iz Alergologije i kliničke imunologije**, Klinički bolnički centar Split, Split, Hrvatska

## MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

## OSTALI JEZICI

- Engleski jezik
- Njemački jezik

## ČLANSTVA

Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju

Hrvatsko reumatološko društvo

Hrvatski liječnički zbor

## ZNANSTVENI RADOVI

1. **Meter, D.**; Racetin, A.; Vukojević, K.; Balog, M.; Ivić, V.; Zjalić, M.; Heffer, M.; Filipović, N. A Lack of GD3 Synthase Leads to Impaired Renal Expression of Connexins and Pannexin1 in St8sia1 Knockout Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23:6237. <https://doi.org/10.3390/ijms23116237>
2. Meter M, Prusac IK, Glavaš D, **Meter D.** Acute respiratory failure on a low dose of amiodarone - is it an underdiagnosed and undertreated condition? *Respir Med Case Rep.* 2021;34:101500.
3. Meter M, **Meter D**, Cepnija T, Perkovic D. Left Atrial Myxoma and Antiphospholipid Syndrome—A Case Report. *Int J Angiol.* 2021; 01:1-74. doi:10.1055/s-0041-1740103



4. Meter M, Gavran I, **Bajo D**, Duplancic D. An unusual case of acute myopericarditis after the first dose of capecitabine: Need for new cardioprotective strategies and risk stratification. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2021 Dec;59(12):775-779. doi: 10.5414/CP204006. PMID: 34503643.
5. Arapović A, Punda A, Brdar D, Capkun V, **Bajo D**, Veljacic D, Punda H, Simicic-Majce A, Saraga-Babic M, Vukojevic K, Saraga M. Types of Parenchymal Changes Diagnosed on DMSA Scans of Kidneys Affected by Different Grades of Vesicoureteral Reflux. *Med Sci Monit.* 2021;27:e929617. doi:10.12659/MSM.929617
6. **Bajo D**, Begovic A, Boric K, Meter M, Perkovic D. Giant cell arteritis in a patient with bilateral parotid swelling as the first sign of a disease: a case report. *Reumatizam.* 2019; 66(2):75-80. doi: 10.33004/reumatizam-66-2-10
7. Tadin Hadjina I, Zivkovic PM, Matetic A, Rusic D, Vilovic M, **Bajo D**, Puljiz Z, Tonkic A, Bozic J. Impaired neurocognitive and psychomotor performance in patients with inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2019; 9:13740. doi: 10.1038/s41598-019-50192-2