

# Utjecaj taninske kiseline na srčani mišić hiperglikemičnih štakora

---

**Bota, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:171:767041>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Bota**

**UTJECAJ TANINSKE KISELINE NA SRČANI MIŠIĆ HIPERGLIKEMIČNIH**  
**ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2017./2018.**

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

**Split, listopad 2018.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Bota**

**UTJECAJ TANINSKE KISELINE NA SRČANI MIŠIĆ HIPERGLIKEMIČNIH**  
**ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2017./2018.**

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

**Split, listopad 2018.**

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

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

### UTJECAJ TANINSKE KISELINE NA SRČANI MIŠIĆ HIPERGLIKEMIČNIH ŠTAKORA

Ivana Bota, 118

**Sažetak:** Cilj ovog diplomskog je pokazati potencijalni pozitivni ili negativni učinak taninske kiseline na srčani mišić hiperglikemičnih štakora i ekspresiju koneksina 43 upotrebom koncentracije koja je već pokazala korisne učinke. U ovom je istraživanju dvanaest muških Wistar štakora podijeljeno u tri skupine na temelju napitaka koje su konzumirali. U svakoj skupini bila su po četiri štakora, a ispitivanje je trajalo dvadeset tjedana. Prva skupina, odnosno kontrolna skupina konzumirala je čistu vodu za piće, a druga skupina 30%-tnu vodenu otopinu saharoze. Treća skupina konzumirala je 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. Mjerena im je težina, a koncentracije glukoze u plazmi određivane su s glukometrom. Životinje su eutanazirane te njihova srca su uklonjena. Tkivo je pripremljeno i zatim obojeno trikromnim bojanjem po Mallory-ju. Također je napravljeno imunofluorescencijsko bojanje pa su slikane mikrofotografije. Analizirane su pomoću Adobe Photoshop 7 i Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD) programa. GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, USA) korišten je za statističku analizu. Nakon 20 tjedana eksperimenta, razina glukoze u krvi u skupini koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze značajno je povećana u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,05$ ). Razine glukoze u krvi u skupini štakora koje su dodatno konzumirale taninsku kiselinu (0,1%) manje su povećane. Također je došlo do značajnog smanjenja težine ( $p < 0,05$ ) u toj skupini. Nakon analize ustanovili smo da se oštećenje srca uzrokovano visokom koncentracijom glukoze u krvi i primjenom taninske kiseline značajno razlikuje među skupinama ( $p < 0,05$ ). Taninska kiselina nije uzrokovala značajno smanjenje ili povećanje ekspresije koneksina 43 u srcu zbog velike varijabilnosti u skupini tretiranoj taninskom kiselinom ( $p < 0,05$ ). Zaključili smo da se oštećenje srčanog mišića značajno razlikuje među skupinama. Taninska kiselina zajedno s hiperglikemijom u dozi od 0,1% ne uzrokuje značajno smanjenje ili povećanje ekspresije koneksina 43 u srcu. Dodatne studije su potrebne za određivanje uloge koneksina 43 u drugim dijelovima srca te su potrebna daljnja istraživanja za određivanje drugih djelovanja taninske kiseline, neovisnih o njenom antioksidativnom učinku.

**Ključne riječi:** šećerna bolest tip 2, taninska kiselina, srce, kronična hiperglikemija, koneksin 43

**Rad sadrži:** 42 stranice, 7 slika, 2 tablice, 65 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med. - predsjednik
2. doc. dr. sc. Snježana Mardešić, dr. med. - član
3. doc. dr. sc. Natalija Filipović, dr. med. vet. - član-mentor

**Datum obrane:** 22. listopada 2018.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

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

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

### THE EFFECT OF TANNIC ACID ON THE CARDIAC MUSCLE OF HYPERGLYCEMIC RATS

Ivana Bota, 118

**Summary:** The aim of this thesis is to demonstrate the potential positive or negative effect of the tannic acid on the cardiac muscle of hyperglycemic rats and the expression of the connexins 43 using a concentration that has already shown beneficial effects. In this trial twelve male Wistar rats were divided into three groups based on beverages they were consuming. There were four rats in each group and Trial lasted twenty weeks. The control group consumed clean drinking water and the second group consumed 30% aqueous sucrose solution. Third group consumed 30% aqueous solution of sucrose and 0,1% tannic acid. They were weighed on electronic balance and their glucose concentrations in plasma were determined with glucometer at the same time. Animals were euthanized and their hearts were removed. The tissue was prepared and then stained by Mallory's trichrome stain. Tissues were also analysed with immunohistochemistry and then microphotographies were taken. Microphotographies were analyzed by Adobe photoshop 7 and Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, USA) was used for statistical analysis. After 20 weeks of experiment blood glucose levels of group that had consumed 30% aqueous solution of sucrose significantly increased compared to the control group ( $p < 0,05$ ). Blood glucose levels in the group of rats that additionally consumed tannic acid (0,1%) blood increased less. Also there was significant weight reduction ( $p < 0,05$ ) in that group. After analysis we found that damages of the heart caused by high blood glucose concentration and consumption of tannic acid were significantly different among the groups ( $p < 0,05$ ). Tannic acid did not caused statistically significant ( $p < 0,05$ ) reduction or increase in the expression of connexins 43 in the heart because of great variability in group that consumed tannic acid. We concluded that heart muscle damage is significantly different among the groups. Tanic acid together with hyperglycemia in a dose of 0.1% does not cause a significant decrease or increase in the expression of connexin 43 in the heart muscle. Additional studies are needed to determine the role of connexin 43 in other parts of the cardiac muscle and further research is needed to determine the other effects of tannic acid regardless of its antioxidant effect.

**Key words:** diabetes mellitus type 2, tannic acid, heart, chronic hyperglycemia, connexin 43

**Thesis contains:** 42 pages, 7 figures, 2 tabels, 65 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Katarina Vukojević, PhD, MD, professor - chair person
2. Snježana Mardešić, PhD, MD, assistant professor - member
3. Natalija Filipović, PhD, DVM, assistant professor - supervisor

**Defence date:** October 22, 2016

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

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Šećerna bolest tip 1</b> .....	3
<b>1.2. Šećerna bolest tip 2</b> .....	4
<b>1.3. Komplikacije šećerne bolesti</b> .....	5
<b>1.4. Dijabetička kardiomiopatija</b> .....	6
<b>1.5. Taninska kiselina</b> .....	9
<b>1.6. Koneksini</b> .....	10
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	13
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	15
<b>3.1. Eksperimentalne životinje</b> .....	16
<b>3.2. Model šećerne bolesti u štakora</b> .....	16
<b>3.3. Priprema tkiva za bojanja</b> .....	16
<b>3.4. Trikromno bojanje po Mallory-ju</b> .....	17
<b>3.5. Imunofluorescencijska bojanja</b> .....	17
<b>3.6. Analiza mikrofotografija i kvantifikacija</b> .....	18
<b>3.7. Statistička analiza podataka</b> .....	18
<b>4. REZULTATI</b> .....	19
<b>4.1. Razine glukoze u krvi i tjelesne mase štakora nakon dvadeset tjedana istraživanja</b> .....	20
<b>4.2. Morfološke promjene u srcu štakora uzrokovane kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline</b> .....	21
<b>4.3. Promjene izražaja koneksina 43 u srcu štakora uzrokovane kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline</b> .....	23
<b>5. RASPRAVA</b> .....	25
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	29
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	31
<b>8. SAŽETAK</b> .....	37
<b>9. SUMMARY</b> .....	39
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	41

*Velika zahvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Filipović na svakom savjetu, pomoći, preporukama, pohvalama, kritikama, poticanju mojeg istraživačkog duha, velikom strpljenju i bezbroju udjeljenih sati i razmijenjenih poruka tijekom moje izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala Vam jer ste uvijek bili tu za sva moja pitanja i uistinu prepoznali sve moje mane i vještine!*

*Hvala Benjaminu Benzoni dr.med. na pomoći kada je bila potrebna!*

*Hvala svima koje sam upoznala u laboratoriju na ugodnoj atmosferi tijekom ovog cijelog razdoblja!*

*Hvala mojim kolegama koji su sada i više od prijatelja na svakom trenutku koji smo proveli zajedno jer bez njih doslovno ni jedan dan mojeg školovanja ne bi bio zabavan kao što je bio!*

*Posebna zahvala mojoj obitelji bez koje ništa što sam postigla ne bi bilo moguće, a posebno mojim roditeljima koji su me svojim primjerom naučili da uvijek postupim ispravno u svakoj situaciji!*

*Na kraju svojeg eksperimentalnog istraživanja mogu samo zaključiti : „ I would never die for my beliefs because I might be wrong!“*

## **1. UVOD**



Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) je kronična bolest koju karakterizira poremećaj metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelancevina, uzrokovan nedovoljnim lučenjem inzulina iz beta stanica Langerhansovih otočića gušterače ili smanjena osjetljivost tkiva na inzulin. Za šećernu bolest je karakteristična kronična hiperglikemija, odnosno povišena koncentracija glukoze u krvi. Kronično povećanje glukoze u krvi uzrokuje brojne komplikacije u organizmu oboljelih te dolazi do oštećenja većine tkiva što povećava rizik za razvoj brojnih akutnih i kroničnih bolesti (1, 2).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. World health organization, WHO) šećerna bolest predstavlja sve važniji javnozdravstveni problem zbog sve većeg broja osoba oboljelih od šećerne bolesti u cijelom svijetu. Naime, 1980. godine u svijetu je bilo 4,7% oboljelih od šećerne bolesti, a 2014. godine taj postotak se povećao na 8,5% svjetskog stanovništva. U 2012. godini je od posljedica šećerne bolesti preminulo 1,5 milijun ljudi. Šećerna bolest je bila u podlozi još dodatnih 2,2 milijuna smrtnih slučajeva zbog povećanog rizika za razvoj kardiovaskularnih i ostalih bolesti (3).

Međunarodna dijabetička federacija (International Diabetes Federation, IDF) je iznijela podatak za 2015. godinu gdje navodi da u svijetu 415 milijuna ljudi boluje od šećerne bolesti što znači da svaka jedanaesta odrasla osoba boluje od šećerne bolesti. Procjena je i da će do 2040. godine broj oboljelih porasti na 642 milijuna, a 46,5% odraslih oboljelih od šećerne bolesti još uvijek ni nema službenu dijagnozu. Također se pokazalo da polovica onih kojima je dijagnosticirana bolest ne prima prikladnu terapiju ili je se ne pridržava, odnosno nije postignut željeni terapijski cilj. Liječenje šećerne bolesti i njenih komplikacija čini 12% svjetskih troškova za zdravstvo odnosno 673 milijarde dolara (4).

Iako se simptomi šećerne bolesti ne moraju javiti kod svih pojedinaca, najčešći simptomi šećerne bolesti su učestalo mokrenje ili poliurija, povećani apetit ili polifagija, pojačana žeđ ili polidipsija te gubitak tjelesne težine i umor (5).

Ciljne vrijednosti HbA1c i glukoze u krvi koje se nastoje postići u regulaciji kronične hiperglikemije su 2016. određene hrvatskim smjernicama. Preporuka je da se vrijednosti glikiranog hemoglobina (HbA1c) spuste ispod ili oko 7%. Preporuča se i postizanje značajnije sniženih vrijednosti HbA1c od 6% do 6,5% ako se to može postići bez znatne hipoglikemije u osoba mlađe životne dobi, kraćeg trajanja šećerne bolesti, dužeg očekivanog životnog vijeka i bez prisutnih znatnih kardiovaskularnih bolesti. Ciljne vrijednosti glikiranog hemoglobina od 7,5 do 8,0% se nastoje postići kod osoba u starijoj životnoj dobi, onih sklonih hipoglikemijskim

epizodama te kod osoba koje imaju razvijene mikrovaskularne ili makrovaskularne komplikacije, odnosno kod onih osoba koji imaju prisutne različite komorbiditete te ako bolest traje duže vrijeme. Cilj je da se prosječna koncentracija glukoze u plazmi održava u vrijednostima od približno 8,3 do 8,9 mmol/L, odnosno bilo bi najbolje kada bi koncentracija glukoze u plazmi natašte ili preprandijalno iznosila od 3,9 do 7,2 mmol/L, a postprandijalno do 7,8 mmol/L (6).

Šećerna bolest se etiološki može podijeliti u četiri velike skupine:

1. šećerna bolest tip 1 – imunološki posredovana i idiopatska, ovisna o inzulinu,
2. šećerna bolest tip 2 – neovisna o inzulinu
3. šećerna bolest tip 3 – radi se o drugim uzrocima kao su pankreatitis, druge bolesti koje nisu povezane s disfunkcijom gušterače, uzrokovana lijekovima.
4. šećerna bolest tip 4 – gestacijski dijabetes, povećana razina glukoze u krvi koja se prvi put pojavljuje u trudnoći (2).

### **1.1. Šećerna bolest tip 1**

Šećerna bolest tip 1 ili šećerna bolest ovisna o inzulinu (engl. diabetes mellitus type 1, DM1; insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) obuhvaća 5-10 % oboljelih. Može se pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali ipak se najčešće razvija tijekom djetinjstva, a njeni simptomi se pojavljuju u adolescenciji. Dijeli se na imunosnu i idiopatsku šećernu bolest. Imunosna šećerna bolest tip 1 je najčešći oblik šećerne bolesti tip 1. Za imunosni oblik je značajno to da joj prethodi faza kada nisu prisutni nikakvi simptomi odnosno inzulitis. Tada T stanice imunološkog sustava napadaju i uništavaju beta stanice gušterače pa dolazi do teškog ili potpunog nedostatka inzulina. Protutijela na stanice otočića, enzim - dekarboksilazu glutaminske kiseline (GAD), inzulin i tirozin – fosfatazu često su prisutna u krvi oboljelih (1, 2).

Genetički je utvrđena i povezanost s HLA (engl. Human Leucocyte Antigens) lokusom za imunosni tip no za početak autoimunog odgovora važni su brojni drugi čimbenici. Osobe su vrlo često sklone i ostalim autoimunim bolestima kao što su Addisonova bolest, Hashimotov tireoiditis, Gravesova bolest, vitiligo, celijakija, miastenija gravis (2).

Nadomjesno liječenje inzulinom je nužno za osobe s dijabetesom tipa 1 zbog nastanka dijabetičke ketoacidoze (1). Ketoacidoza u dječjoj dobi nastaje naglo zbog potpunog nedostatka inzulina, a u starijih osoba dijelom je sačuvana funkcija  $\beta$ - stanica te je time sprječena ketoacidoza tijekom duljeg vremenskog perioda. Ketoacidoza nastaje zbog prekomjerne razgradnje masnih kiselina te nastanka razine ketokiselina koja je toksična za organizam (2).

## 1.2. Šećerna bolest tip 2

Šećerna bolest tip 2 ili šećerna bolest neovisna o inzulinu (engl. diabetes mellitus type 2; DM2; non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) karakterizirana je neosjetljivošću perifernih tkiva na djelovanje inzulina. Na početku  $\beta$ -stanice uspijevaju regulirati povišenu razinu glukoze u krvi pa je tada razina inzulina u krvi normalna ili nešto viša od normalne. Kako bolest napreduje lučenje inzulina više ne može zadovoljiti potrebe organizma te dolazi do porasta razine glukoze u krvi. Bolest je povezana s više faktora kao što je dob, tjelesna masa, fizička neaktivnost i neadekvatna prehrana, ali može biti i genetski uvjetovana što još nije u potpunosti razjašnjeno. Metabolički sindrom je česti komorbiditet bolesnika sa šećernom bolesti koji uz centralni oblik pretilosti uključuje i hiperglikemiju, hipertenziju i dislipidemiju (2). Studije su pokazale i različitu prevalenciju šećerne bolesti tip 2 među etničkim skupinama kod osoba bez prekomjerne tjelesne težine i pretilosti što bi buduća istraživanja trebala razjasniti (7).

Smanjeno je djelovanje inzulina i na masti pa je često razina triglicerida i slobodnih masnih kiselina viša od preporučene, a snižena je razina lipoproteina visoke gustoće (HDL). Neke osobe kojima je dijagnosticirana šećerna bolest tip 2 mogu imati sporo razvijajući tip 1 ili latentni autoimuni dijabetes odraslih (LADA), pa nakon nekog vremena bude potrebno uvođenje inzulina u terapiju. U osoba sa šećernom bolesti tip 2 rijetko se razvija ketoacidoza, ali može nastati u nekim stanjima kada je organizam pod stresom, kod infekcija ili kada se upotrebljavaju lijekovi koji povećavaju rezistentnost kao što su kortikosteroidi. Osobama s ovim oblikom šećerne bolesti uglavnom nije potrebna terapija inzulinom, nego samo oralnim antidijabeticima (1).

Šećerna bolest često uz promjenu životnog stila s vremenom zahtijeva i primjenu više lijekova. Potrebno je djelovati na oštećeni metabolizam glukoze kao što je lučenje inzulina,

pojačana perifernu inzulinsku rezistenciju i povećana glukoneogenezu u jetri. Za to se koriste različiti oralni hipoglikemici, ali zlatni standard je još uvijek metformin, lijek iz skupine bigvanida. Njegovo djelovanje se još uvijek istražuje, ali je poznato da suprimira glukoneogenezu u jetri (8).

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

Visoka razina glukoze u krvi može uzrokovati kronične komplikacije. Nastanak novih komplikacija i napredovanje postojećih mogu biti prevenirani dobrom kontrolom bolesti odnosno glukoze, krvnog tlaka i kolesterola. Kronične komplikacije možemo podijeliti na mikrovaskularne i makrovaskularne. U mikrovaskularne komplikacije ubrajamo retinopatiju, nefropatiju i neuropatiju, a u makrovaskularne koronarnu arterijsku bolest, perifernu arterijsku bolest, te cerebrovaskularne komplikacije (9).

Dijabetička nefropatija uzrokovana je hiperglikemijom koja dovodi do oštećenja malih krvnih žila što dovodi do slabije opskrbe bubrega krvlju te zatajenja. Dolazi do zadebljanja i skleroze bazalne membrane glomerula. Glomeruli se oštećuju i propuštaju proteine u urin. Jedan od najranijih znakova nefropatije je mikroalbuminurija ( $\geq 30$  mg/dan ili  $20 \mu\text{g}/\text{min}$ ) (9).

Zbog ishemije živaca radi oštećenja mikrocirkulacije te direktnog učinka hiperglikemije na neurone i poremećenog staničnog metabolizma dolazi do razvoja dijabetične neuropatije, koja može uzrokovati razvoj težih infekcija i rezultirati amputacijama. Simetrična polineuropatija zahvaća šake i stopala te se pri tom javljaju klinički simptomi kao parestezije, dizestezije ili bezbolni gubitak osjeta. Simptomi razvoja autonomne neuropatije su erektilna disfunkcija, problemi s probavom, ortostatska hipotenzija, neurogeni mjehur i tahikardija u mirovanju (10).

Dijabetička retinopatija je jedan od najčešćih uzroka oftalmoloških problema. Glaukom, katarakta i drugi poremećaji oka javljaju se ranije i češće kod osoba s dijabetesom. Osobama oboljelima od dijabetesa tip 1 preporučuje se pregled kod oftalmologa pet godina nakon dijagnoze, a onima s dijabetesom tip 2 odmah pri dijagnozi (10).

Osobe oboljele od dijabetesa imaju viši rizik od prosječnog za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Zapravo, dvije od tri osobe s dijabetesom umiru od bolesti srca ili moždanog udara.

Zbog povišene glukoze, kolesterola i krvnog tlaka dolazi do oštećenja srca i krvnih žila. Začepljene krvne žile mogu dovesti do srčanog udara, moždanog udara, periferne arterijske bolesti i drugih problema. Boljom kontrolom šećerne bolesti smanjuje se rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (10-12).

Kako bi se odgodile ili prevenirale moguće komplikacije šećerne bolesti nužno je kontrolirati razinu glukoze u krvi. Međutim, potrebno je uzeti u obzir koristi i rizike intenzivnije kontrole razine glukoze u krvi (13).

#### **1.4. Dijabetička kardiomiopatija**

Zatajenje srca je često kod osoba oboljelih od dijabetesa tip 2 s incidencijom dva i pol puta većom nego u zdravih osoba (14). Ishemijska srčana bolest i hipertenzija povezani su sa zatajenjem srca u 65% i 75% oboljelih (15).

Međutim, neki pacijenti imaju simptome zatajenja srca bez koronarne, hipertenzivne, valvularne, kongenitalne, toksične ili virusne etiologije, zbog čega je potrebno uzeti u obzir pojam dijabetičke kardiomiopatije (16).

Ovisno radi li se dominantno o hipertrofiji kardiomiocita ili apoptozi razlikujemo dva različita fenotipa, odnosno zatajenje srca s očuvanom e젝cijskom frakcijom i smanjenom dijastoličkom funkcijom, koje je zabilježeno kao češće kod osoba s dijabetesom tip 2, te zatajenje srca sa smanjenom e젝cijskom frakcijom lijevog ventrikula (17).

Jedan od najranijih znakova dijabetičke kardiomiopatije je povećanje krutosti miokarda (18). Kod asimptomatskih pacijenata s dijabetesom tip 2 krutost miokarda je povezana s povećanom smrtnosti (19). Metaanaliza od 10 studija koje su obuhvatile 178.929 sudionika, koji su većinski imali šećernu bolest tip 2, potvrdila je da je povećanje HbA1c u krvi povezano s većim rizikom za zatajenje srca (20).

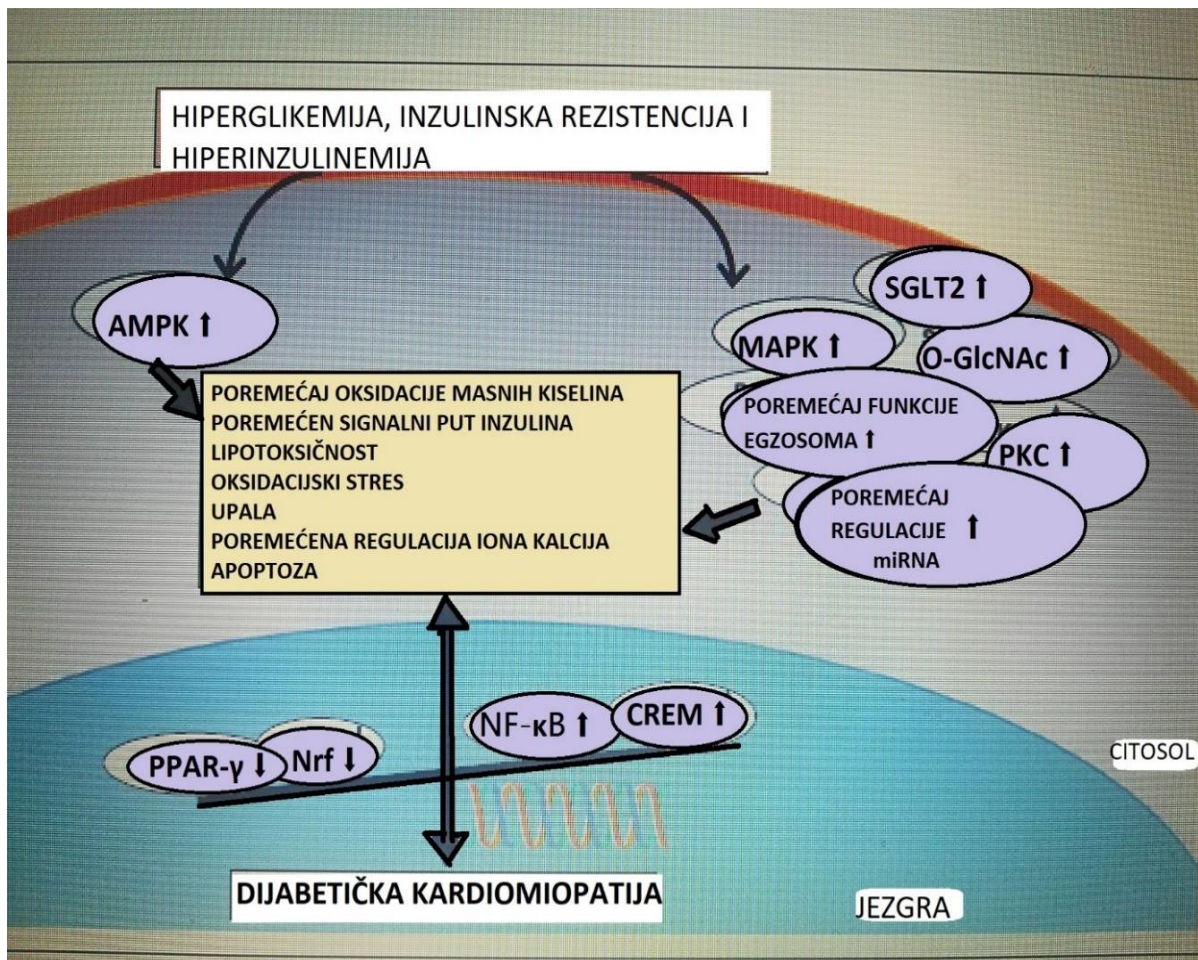
Ipak, patofiziologija bolesti ostaje kompleksna jer brojni čimbenici mogu utjecati na njen razvoj. Hiperglikemija, rezistencija na inzulin i hiperinzulinemijom potaknuta inzulinska rezistencija i metabolički poremećaji koji povećavaju disfunkciju mitohondrija, oksidativni stres, završni produkti uznapredovale glikacije (AGE), oštećena mitohondrijska regulacija kalcijevih iona, upala, aktivacija renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS),

autonomna neuropatija, apoptoza kardiomiocita, kao i mikrovaskularna disfunkcija dovode do krutosti, hipertrofije i fibroze srca, što rezultira dijastoličkom i sistoličkom disfunkcijom te zatajenjem srca (21).

Za razliku od onoga što se opaža kod dijabetesa tip 2, klinički podaci pokazuju da kod dijabetesa tip 1 ne dolazi do nakupljanja lipida u srcu. Stoga, ovi rezultati upućuju na to da kod tih bolesnika lipotoksičnost vjerojatno nije jedan od faktora za razvoj kardiomiopatije kao u bolesnika s dijabetesom tip 2 (22). I kod bolesnika s dijabetesom tip 1 također postoji veza između hiperglikemije i krutosti miokarda (23). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja da bi se razumjele potencijalne razlike u fenotipu i mehanizmu nastanka dijabetičke kardiomiopatije između dijabetesa tip 1 i tip 2 (24).

Razvoj fibroze miokarda uključuje taloženje kolagena i njegovo umrežavanje, srčanu intersticijsku fibrozu, progresivno nestajanje mišićnih fibrila, perivaskularnu fibrozu, zadebljana i sklerozu malih koronarnih žila, kao i koronarnu mikrovaskularnu sklerozu i mikroaneurizme (25). Aktivacija RAAS i simpatikusa, vezanje AGE na receptore na staničnoj površini, hiperinzulinemija i hiperglikemija zajedno dovode do aktivacije transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta 1$  što dovodi do degradacije izvanstaničnog matriksa (26). Koncentracija nekih biomarkera sinteze kolagena, uključujući upalne citokine, čimbenika rasta vezivnog tkiva, metaloproteinaze i galektina-3 povećana je kod fibroze miokarda (27).

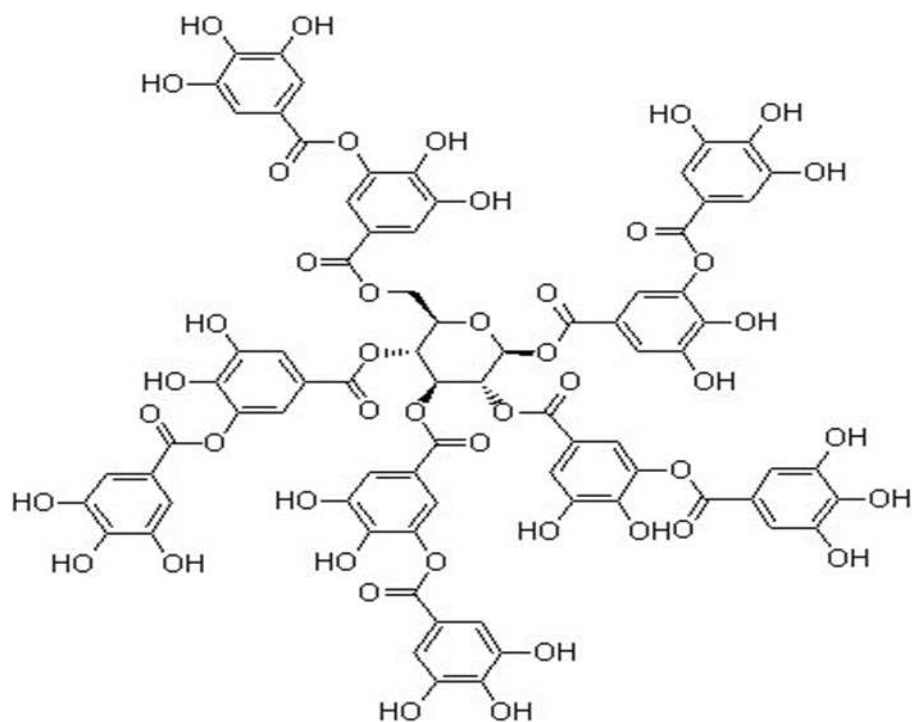
Temelj patofizioloških događaja čini nekoliko proteina i signalnih putova (vidi sliku 1). Ipak, formalna definicija za dijabetičku kardiomiopatiju kao zasebni klinički entitet ostaje dvojbena zbog nedostatka prihvaćenih dijagnostičkih kriterija i informacija o bolesti u njenoj ranoj fazi. Trenutno ne postoje specifična histološka svojstva, biokemijski markeri ili klinička manifestacija za konačnu dijagnozu dijabetičke kardiomiopatije. Također, nema prospektivnih kliničkih studija koje pokazuju da hiperglikemija ili hiperinzulinemija povećavaju rizik za razvoj dijabetičke kardiomiopatije u odsutnosti drugih čimbenika rizika, kao što su pretilost, koronarna bolest srca i hipertenzija (24).



**Slika 1. Signalni putovi i molekularni proteini uključeni u nastanak dijabetičke kardiomiopatije uzrokovane hiperglikemijom i inzulinskom rezistencijom.** Povećana razina protein kinaze C (PKC), mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), kotransportera natrij-glukoza tip 2 (SGLT2), O-vezanog N-acetilglukoamina (O-GlcNAc), signalizacija putem proteina modulatora odgovora cikličkog adenozin 5'-monofosfat (CREM), disregulacija mikroRNA (miRNA) i egzosoma i smanjenje AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK), receptora za aktivator proliferacije peroksisoma-gamma (PPAR- $\gamma$ ) i nuklearnog faktora eritroid 2-povezan faktor 2 (Nrf2) inducira srčanu inzulinsku rezistenciju, abnormalnosti subcelularnih komponenti, metaboličke poremećaje i strukturne promjena, što rezultira dijabetičkom kardiomiopatijom. Preuzeto i modificirano od: Jia G, Hill M, Sowers J. Diabetic Cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2018;122(4):624-638.

## 1.5. Taninska kiselina

Taninsku kiselinu nalazimo u lišću, korijenju, voću i kori mnogih biljaka. Radi se o hidrofilnom polifenolnom spoju visoke molekularne mase. Taninska kiselina sadrži glukozu vezanu na galoil estere (vidi sliku 2) (28). Nalazi se u brojnim namirnicama kao što je voće, crveno vino, mahunarke i ljekovito bilje (29).



**Slika 2. Kemijska struktura taninske kiseline.** Izvor: Zhang H, Cui H, Yao S, Zhang K, Tao H, Meng H. Ionic liquid-stabilized non-spherical gold nanofluids synthesized using a one-step method. *Nanoscale Research Letters*. 2012;7(1):583.

Taninska kiselina posjeduje antioksidativno djelovanje, odnosno štiti stanice od stresa uzrokovanog nastankom slobodnih radikala (30). Taninska kiselina također djeluje i antiinflamatorno (31) te se pokazalo da taninska može biti potencijalno terapijsko sredstvo za atopijski dermatitis djelujući putem indukcije PPAR- $\gamma$  (32). Posjeduje i antikancerogeno (33), antimikrobno (34) te kelirajuće (35) djelovanje. Dokazano je da taninska kiselina može spriječiti vezanje virusa gripe tip A i humanog papiloma virusa pri relativno niskim koncentracijama (36).

Osim toga, taninska kiselina posjeduje i antidijabetičke učinke djelovanjem na postprandijalno smanjenje glukoze u krvi (37) te inducira transport glukoze putem aktivacije



inzulinom uvjetovanih signalnih putova u adipocitima i inhibicijom adipocitne diferencijacije (38).

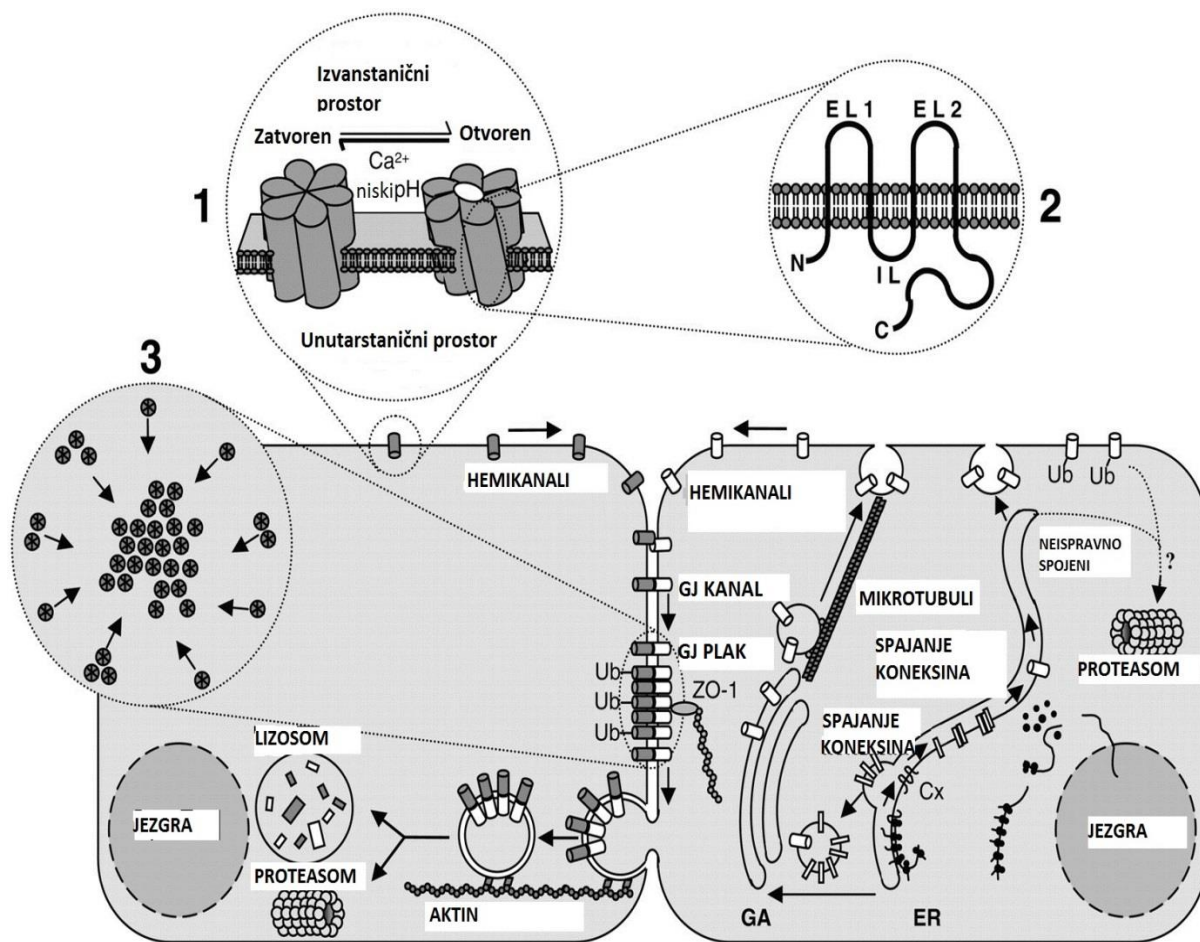
Međutim, taninska kiselina može djelovati i prooksidativno vežući se za DNA (30) te djeluje citotoksično na određene stanice (39). Pokazalo se da može smanjiti oksidativni stres i porast glukoze u krvi, ali da ne utječe na poboljšanje patološke slike masnih stanica u testisima (40). Nasuprot tomu, biokemijski i histopatološki rezultati su pokazali da primjena taninske kiseline ima pozitivan učinak na negativne posljedice ishemije u tkivu mozga (41). Vjeruje se da antioksidativni i prooksidativni učinci taninske kiseline ovise o njenoj koncentraciji i tipu stanica (42, 43).

## 1.6. Koneksini

Kod ljudi različite izoforme transmembranskih proteina koneksina (Cx) kodira 21 različiti gen. Oni tvore koneksone, odnosno hemikanale ako se nalaze na staničnoj membrani i propusne veze (engl. gap junctions) između dvije stanice (44). Propusne veze formiraju vodenu poru koja izravno povezuje citoplazme susjednih stanica, a propusnu vezu čine dva hemikanala gdje svaka kontaktna stanica osigurava jedan. Hemikanali se sastoje od šest koneksina (Cx) organiziranih oko središnje pore koji, ako ne sudjeluju u formiranju propusne veze, komuniciraju s ekstracelularnom tekućinom i time osiguravaju parakrino i autokrino djelovanje. Hemikanali i propusne veze omogućuju razmjenu iona i malih molekula, poput ATP-a, glukoze, NAD<sup>+</sup>, sekundarnih glasnika (npr. cAMP, cGMP), nukleotida, malih peptida i siRNA (45, 46).

U usporedbi s većinom transmembranskih proteina, koneksini imaju kratak poluživot (<5 sati), što zahtijeva njihovu brzu sintezu, transport i degradaciju kako bi se održala odgovarajuća razina propusnih veza i hemikanala na staničnoj membrani (45). Važnu ulogu kao modulatori funkcionalnog stanja propusne veze i hemikanala imaju unutarstanični i izvanstanični ioni kalcija (Ca<sup>2+</sup>), pH te fosforilacija (47-49). Međutim, sve veći je interes za proučavanjem uloge oksidoredukcijskog potencijala kao modulatora koneksina (Cx) (50).

Do sinteze koneksina dolazi na endoplazmatskom retikulumu. Nakon toga slijedi njihovo spajanje u koneksone u trans-Golgijevom aparatu i prenošenje do stanične membrane gdje formiraju propusne veze (vidi sliku 3) (51).



**Slika 2. Proces sinteze i razgradnje koneksina.** 1. Ravnotežno stanje između otvorene i zatvorene konformacije hemikanala. 2. Smještaj koneksina u staničnoj membrani. 3. Pogled na rastući broj propusnih veza. Preuzeto i modificirano od: Desplantez T, Dupont E, Severs NJ, Weingart R. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol.* 2007;218:13–28.

### 1.6.1. Koneksin 43 (Cx43)

Koneksini se klasificiraju prema njihovoj molekularnoj masi. Za srce su značajne tri izoforme, točnije Cx43, Cx40 i Cx45. Cx43 je glavna izoforma u srcu i prisutna je u ventrikularnim kardiomiocitima, ali i u atriju, fibroblastima i endotelnim stanicama. Cx40 se većinom nalazi u atriju i u koronarnim endotelnim stanicama, koje također izražavaju i Cx37. Cx45 je izražen u provodnom sustavu srca u fiziološkim uvjetima (52). Važnost Cx43 kao proteina koji sudjeluje u formiranju propusnih veza je opisana i karakterizirana u nekoliko modela u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. Međutim, osim dobro opisane lokalizacije Cx43 na području prijelaznih ploča (disci intercalares), Cx43 također je prisutan u drugim

odjeljcima. Na staničnoj membrani, Cx43 je lokaliziran i periferno od područja propusnih veza posloženih u obliku plaka gdje sudjeluje u međumolekulskim interakcijama i prijenosu natrija (53, 54). Nedavna studija pokazuje prisutnost Cx43 unutar egzosoma, izvanstaničnih vezikula koje formiraju i oslobodaju različite vrste stanica, uključujući stanične linije srca. Oni sudjeluju u međustaničnoj komunikaciji na većim udaljenostima. Unutar egzosoma, Cx43 tvori hemikanale i sudjeluje u interakciji između egzosoma i ciljne stanice (55). Istraživanja su pokazala prisutnost Cx43 unutar mitohondrija čija se uloga sve više istražuje (56). Cx43 je bitan za razvoj te se pokazalo da embriji miša s homozigotnim nedostatkom Cx43 umiru pri rođenju (57).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

S obzirom na rastuću primjenu taninske kiseline te generalno antioksidansa u liječenju brojnih bolesti, odlučili smo se provesti ovo istraživanje da bi nadopunili dosadašnja saznanja o njenom djelovanju na životinjski i ljudski organizam. Veći broj provedenih istraživanja pokazao je povoljan učinak taninske kiseline, dok je manji broj pokazao njen negativan učinak te se vjeruje da učinci taninske kiseline ovise o njenoj koncentraciji i tipu stanica. Cilj ovog diplomskog rada je pokazati njen potencijalan pozitivan ili negativan učinak na srčani mišić hiperglikemičnih štakora i izražaj koneksina 43 u srcu u koncentraciji koja je već pokazala povoljne učinke.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. Eksperimentalne životinje

Ovo istraživanje je odobrilo Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprava za veterinarstvo i nacionalno Etičko povjerenstvo (broj odobrenja EP 13/2015). Dio sredstava potrebnih za provođenje ovog istraživanja dolazi od projekta Nutritivna modulacija metabolizma dokozaheksaenske kiseline kod dijabetičke dislipidemije (HRZZ 8992). Dvanaest muških štakora soja Wistar, na kojima je provedeno istraživanje, je bilo smješteno u polikarbonatne kaveze kroz dvadeset tjedana. Istraživanje je provedeno u kontroliranim uvjetima gdje je temperatura iznosila  $22 \pm 1$  °C te se izmjena ciklusa svijetla/tame provodila svakih 12 sati. Kada je istraživanje započelo svi štakori su izvagani. Njihova težina je bili približno jednaka, odnosno iznosila je  $220 \pm 10$  g.

### 3.2. Model šećerne bolesti u štakora

Štakori su podijeljeni u tri grupe po četiri štakora nakon početna dva tjedna prilagodbe. Nasumično su podijeljeni ovisno o otopini koji su konzumirali. Otopine su pripremane svakodnevno. Kontrolna skupina je bila prva, a kao napitak su dobivali čistu vodu. Za drugu skupinu je pripravljena 30%-tna vodena otopina saharoze, a treća skupina je konzumirala također 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. Doza koja je korištena u ovom istraživanju je najčešće korištena i u istraživanjima je pokazala povoljne učinke (58). Štakori su konzumirali hranu *ad libitum*, sastojala se od 18% bjelančevina i 5% masti. Štakori su svaki tjedan u 8:00 sati ujutro vagani, a koncentracija glukoze u krvi im je mjerena pomoću Accu-Chek Go aparata uvijek u isto vrijeme (59).

### 3.3. Priprema tkiva za bojanja

Nakon što je prošlo dvadeset tjedana štakori su eutanizirani općom anestezijom (Narketan®, 80 mg/kg + Xylapan®, 12 mg/kg, Vétoquinol, Bern, Švicarska). Srca su uklonjena i stavljena u Zambonijev fiksativ (4% paraformaldehid i 0.20% pikrinska kiselina u 0,1 M fosfatnom puferu (PBS), pH 7,4). Nakon ispiranja u fosfatnom puferu (PBS), tkiva su dehidrirana u otopinama etanola rastućih koncentracija i uklopljena u parafin. Parafinski

blokovi rezani su na debljinu od 5  $\mu\text{m}$ , korištenjem mikrotoma (Leica RM2155, Pittsburg, PA, SAD) te su potom postavljena na predmetna stakalca. Zatim je obavljena deparafinizacija rezova tkiva u ksilenu, rehidracija u otopinama etanola padajućih koncentracija te kratko ispiranje u destiliranoj vodi. Nakon toga rezovi tkiva su grijani u citratnom puferu (pH 7) dvanaest minuta, nakon čega je slijedilo hlađenje na sobnu temperaturu. Potom se pristupilo histološkom ili imunohistokemijskom bojanju.

### **3.4. Trikromno bojanje po Mallory-ju**

Uzorci su inkubirani tijekom pet minuta u hematoksilinu. Potom je slijedilo ispiranje u vodi iz slavine, a zatim inkubiranje u kiselom fuksinu. Kiseli fuksin je ispiran više puta u destiliranoj vodi. Nakon ispiranja uzorci su diferencirani u 1% fosfomolibdenskoj kiselini tijekom jedne minute te su ponovno isprani u destiliranoj vodi i stavljeni da se inkubiraju tijekom petnaest minuta u anilinsko modri. Uzorci su se još jednom isprali u destiliranoj vodi pa je slijedila diferencijacija tijekom jedne do pet minuta u octenoj kiselini. Diferencirani uzorci su se dehidrirali u etanolu i ksilenu.

### **3.5. Imunofluorescencijska bojanja**

Bojanje je izvršeno primarnim protutijelom kože. To je protutijelo protiv koneksina 43 (Anti-Connexin 43 / GJA1 antibody - C-terminal; ab87645; Abcam, Cambridge, Velika Britanija) koje je korišteno u razrjeđenju 1:200. Uzorci su potom inkubirani tijekom noći u vlažnim komorama. Nakon toga su isprani u PBS-u, te inkubirani tijekom jednog sata u mraku sa sekundarnim protutijelom protiv imunoglobulina kože konjugiranog s alexa fluorom 488 (Donkey Anti-Goat IgG H&L; ab150129; Abcam plc. 330 Cambridge, CB4 OFL, Velika britanija), a korišteno razrjeđenje je 1:400. Potom su uzorci ponovno isprani u PBS-u pa je slijedilo bojanje jezgri s DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid) te ispiranje destiliranom vodom. Stakalca su nakon ispiranja ostavljena da se osuše na zraku pa pokrivena pokrovnim stakalcem.



### **3.6. Analiza mikrofotografija i kvantifikacija**

Uzorci su, nakon trikromnog bojanja po Mallory-u, mikroskopirani i fotografirani svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 10x. Fotografirano je u prosjeku dvadeset slika svakog srca. Mikrofotografije su analizirane programom Adobe Photoshop 7 (Adobe, SAD) te Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). U programu Adobe Photoshop 7 saturacija i kontrast namješteni su na 15, a zatim je u programu Image J odabran alat za kanale pa su mikrofotografije napravljene kompozitnima, a plavi kanal je odabran za daljnju analizu u programu Adobe Photoshop 7. Treshold level je namješten na 22, a crna površina je označavala površinu srca zahvaćenu morfološkim promjenama te je njen postotak izračunat.

Nakon imunofluorescencijskog bojanja uzorci su fotografirani mikroskopom (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) s hlađenom digitalnom kamerom (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) pri povećanju od 40x. Fotografirano je u prosjeku dvadeset slika svakog srca. Za analizu mikrofotografija korišten je programom Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Korištena je triangle treshold metoda gdje je crna površina predstavljala imunoreaktivnost koneksina 43 pa je izračunat postotak površine prekrivene imunofluorescencijom.

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

Program GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, SAD) je upotrijebljen za statističku analizu. Za provjeru značajne razlike između skupina korišten je test za linearni trend, a kao statistički značajnu razliku postavili smo  $p < 0,05$ .

#### **4. RESULTATI**

#### 4.1. Razine glukoze u krvi i tjelesne mase štakora nakon dvadeset tjedana istraživanja

**Tablica 1. Razine glukoze u krvi (mmol/L) štakora nakon dvadesetog tjedna istraživanja.**

K – kontrolna skupina koja je konzumirala vodu; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze; Sah+TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. SV – srednja vrijednost glukoze u krvi; SD – standardna devijacija

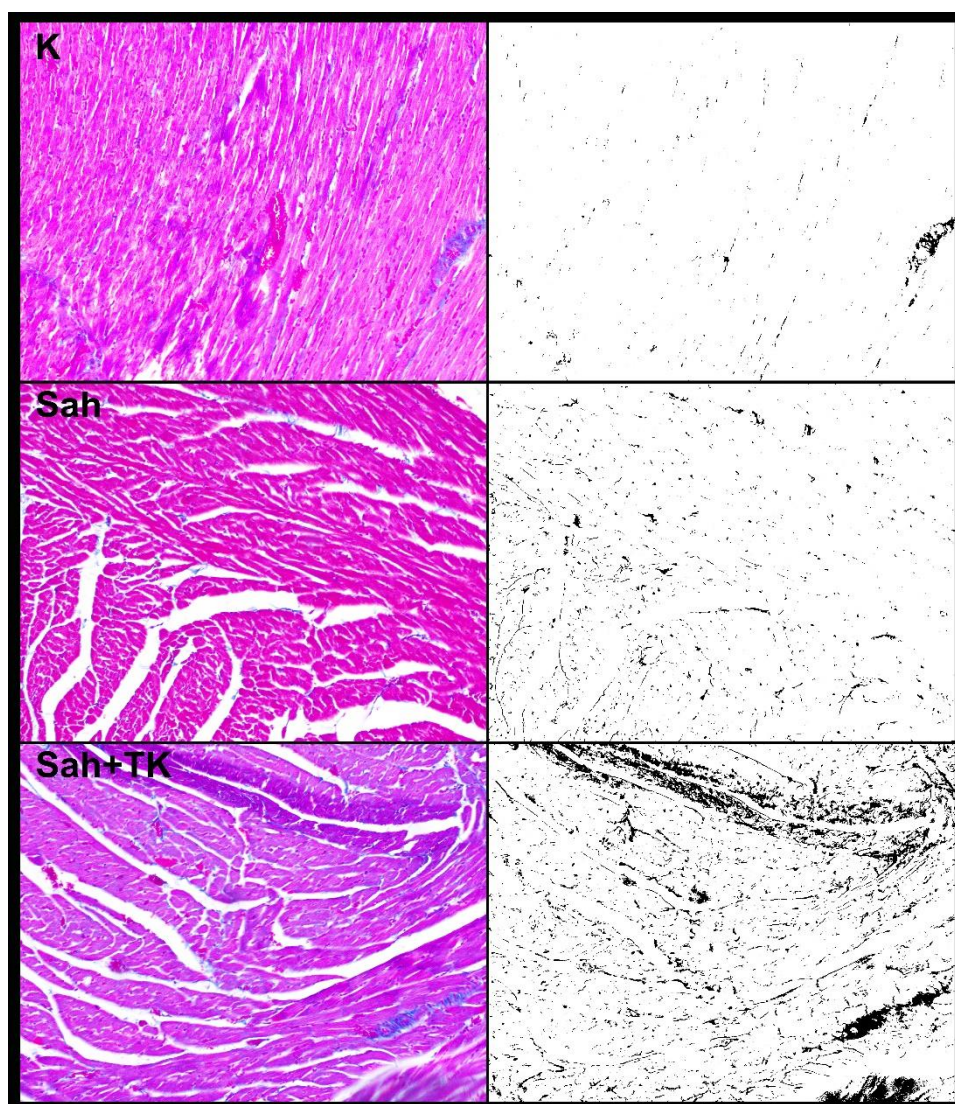
	<i>K</i>	<i>Sah</i>	<i>Sah+TK</i>
SV	7,23	11,88	10,25
SD	0,17	1,27	4,54

**Tablica 2. Tjelesne težine štakora (g) nakon dvadesetog tjedna istraživanja.** K – kontrolna skupina koja je konzumirala vodu; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze; Sah+TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. SV – srednja vrijednost glukoze u krvi; SD – standardna devijacija

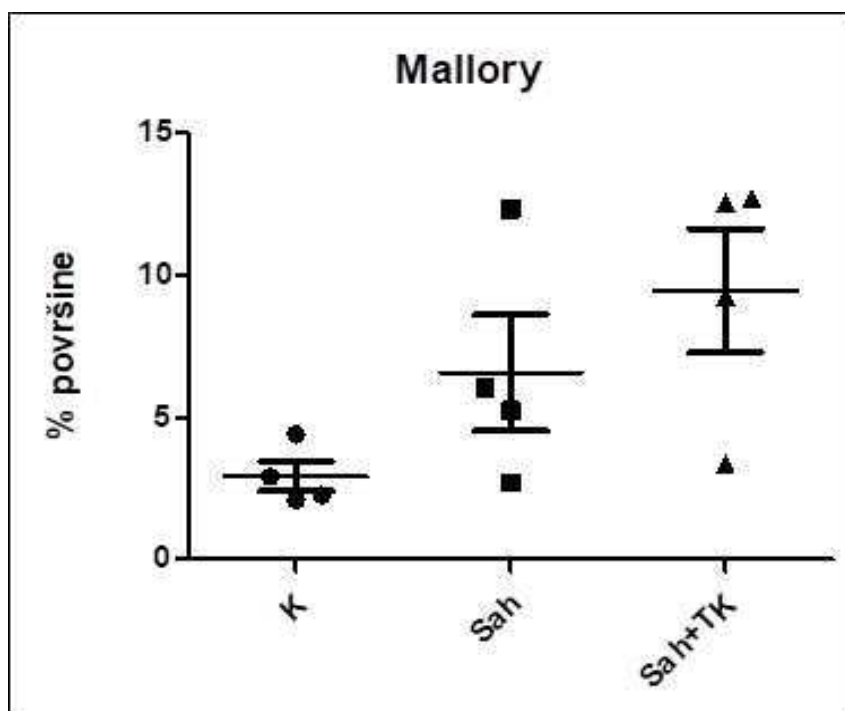
	<i>K</i>	<i>Sah</i>	<i>Sah+TK</i>
SV	311,83	296,65	274,75
SD	13,56	12,71	16,05

Rezultati su pokazali da je Sah skupina imala značajno veću ( $p < 0,05$ ) prosječnu koncentraciju glukoze u krvi u usporedbi s K skupinom. Koncentracija glukoze u krvi Sah+TK skupine se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na K i Sah skupinu (tablica 1). Prosječna vrijednost tjelesne težine skupine Sah+TK bila je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) niža u odnosu na K skupinu (tablica 2).

#### 4.2. Morfološke promjene u srcu štakora uzrokovane kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline



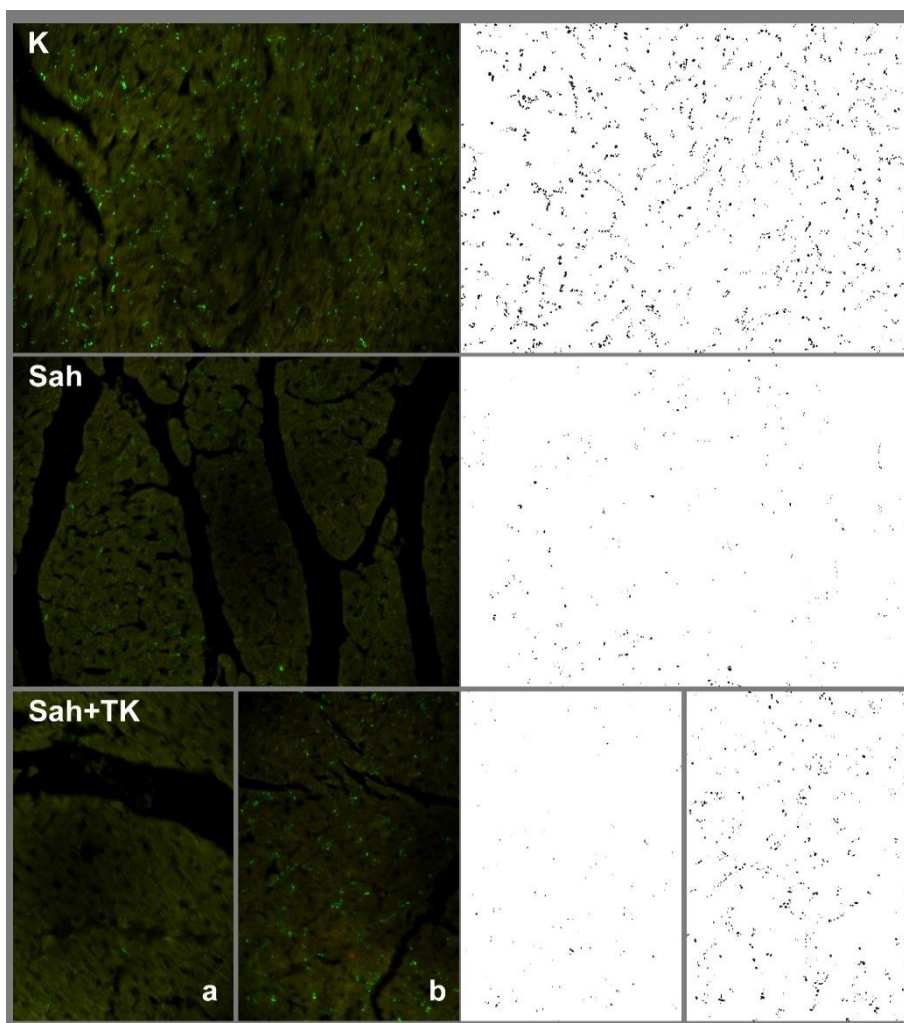
**Slika 4.** Reprezentativni prikaz morfoloških promjena u srcu štakora uzrokovanih kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline. Histološki rezovi srca obojani trikromnim bojanjem po Mallory-ju. Lijevo se nalaze mikrofotografije pri povećanu objektiva 10x, a desno se nalaze istovjetne mikrofotografije koje su obrađene programom Adobe photoshop 7 i ImageJ za daljnju analizu. K – kontrolna skupina koja je konzumirala vodu; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze; Sah+TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu.



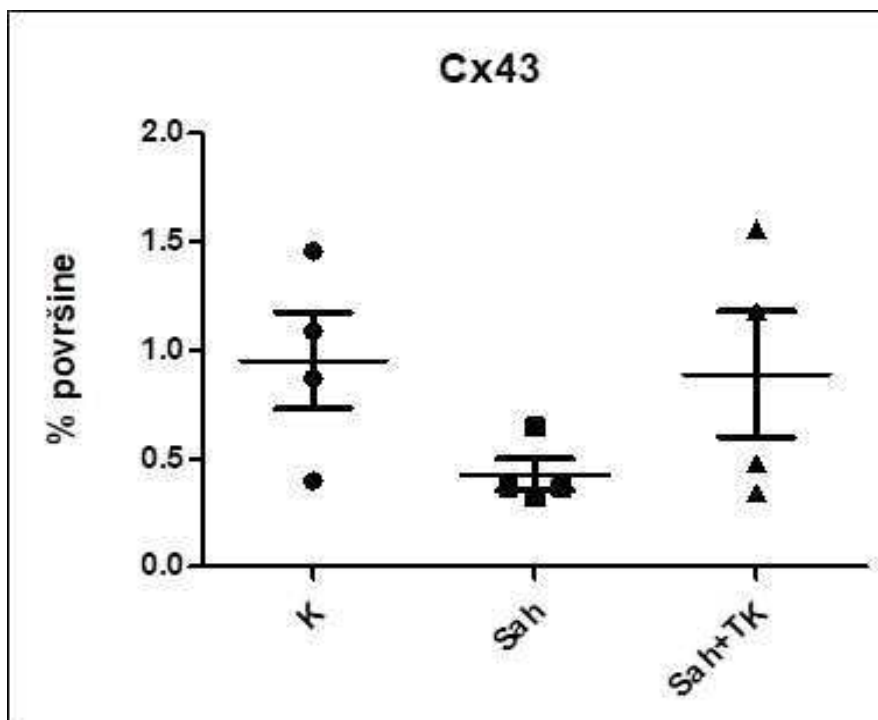
**Slika 5. Grafički prikaz morfoloških promjena u srcu štakora uzrokovanih kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline.** K – kontrolna skupina koja je konzumirala vodu; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze; Sah+TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine s vidljivim morfološkim promjenama.

Na histološkim presjecima srca štakora obojanih postupkom trikromnog bojanja po Mallory-ju vide se morfološke promjene na mišiću srca u skupinama Sah i Sah+TK, koje pokazuju da je došlo do njegovog oštećenja. U skupini Sah+TK vidi se još jače oštećenje s vidljivim sklerotičnim promjenama (slika 4). Analizom je utvrđeno statistički značajno povećanje površine zahvaćene sklerozom među skupinama ( $p < 0,05$ ; slika 5).

#### 4.3. Promjene izražaja koneksina 43 u srcu štakora uzrokovane kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline



**Slika 6. Reprezentativni prikaz promjene izražaja koneksina 43 u srcu uzrokovane kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline.** Lijevo se nalaze histološki rezovi srca obojani imunofluorescencijskim bojanjem pri povećanju objektiva 40x, a desno a desno se nalaze istovjetne mikrofotografije koje su obrađene programom ImageJ za daljnju analizu. K – kontrolna skupina koja je konzumirala vodu; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze; Sah+TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. Primjer srca štakora sa smanjenim izražajem koneksina 43 unutar skupine Sah+TK (a). Primjer srca štakora s povećanim izražajem koneksina 43 unutar skupine Sah+TK (b).



**Slika 7. Grafički prikaz promjene izražaja koneksina 43 u srcu štakora uzrokovane kroničnom hiperglikemijom i primjenom taninske kiseline.** K – kontrolna skupina koja je konzumirala vodu; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze; Sah+TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. Rezultati su prikazani kao postotak analizirane površine prekrivene imunofluorescencijom.

Na histološkim rezovima srca štakora vidi se jaka imunoreaktivnost koneksina 43 na području prijelaznih ploča. Jača imunoreaktivnost koneksina 43 se uočava u skupini K u odnosu na skupinu Sah. Imunoreaktivnost koneksina 43 u skupini Sah+TK je varijabilna, odnosno polovica životinja pokazuje jaku imunoreaktivnost koneksina 43, sličnu kontrolnoj skupini, a plovica vrlo nisku (slika 6). Stoga, nije uočena statistički značajna razlika u promjeni izražaja koneksina 43 u skupini Sah+TK u odnosu na ostale skupine (slika 7).

## **5. RASPRAVA**



Istražili smo utjecaj taninske kiseline na srčani mišić i izražaj koneksina 43 u hiperglikemičnih štakora. Korišten je soj štakora Wistar. Kroničnu hiperglikemiju smo izazvali konzumiranjem 30%-tne vodene otopine saharoze tijekom dvadeset tjedana. Štakori su imali klasične simptome šećerne bolesti tip 2, odnosno uočena je statistički značajno povećana koncentracija glukoze u krvi Sah skupine i blago smanjena tjelesna težina u skupini Sah, nego u skupini K (2).

Nadalje, u skupini Sah+TK zabilježen je blagi pad koncentracije glukoze u krvi i tjelesne mase u usporedbi sa Sah skupinom (tablica 1), ali statistički značajan pad tjelesne težine u usporedbi s K skupinom (tablica 2). Navedeno je u skladu s istraživanjem koje je pokazalo da taninska kiselina smanjuje postprandijalnu koncentraciju glukoze u krvi (37) i s istraživanjem koje je dokazalo da taninska kiselina potiče transport glukoze u adipocite te uzrokuje pad tjelesne težine inhibicijom adipocitne diferencijacije (38).

Patohistološki nalaz srca pokazuje da je konzumiranje 30%-tne vodene otopine saharoze tijekom dvadeset tjedana dovelo do značajnih morfoloških promjena koje ukazuju na uznapredovalo oštećenje srčanog mišića u skupini Sah i skupini Sah+TK u odnosu na K skupinu (Slika 5). Dodatak taninske kiseline izazvana su još značajnija oštećenja, sa znakovima skleroze.

U istraživanju Sen i sur. (2015) životinje su podijeljene u tri skupine od osam životinja. Prvoj skupini je dan 10% etanol intraperitonealno, drugoj skupini inducirano je začepljenje srednje cerebralne arterije i dan im je 10% etanol intraperitonealno, dok je trećoj skupini inducirano začepljenje srednje cerebralne arterije te je tretirana s 10 mg/kg taninske kiseline u 10% -tnom etanolu intraperitonealno. Štakori su žrtvovani 24 h kasnije, a ispitivano je tkivo mozga, biokemijski i histopatološki. Uspoređujući ishemijsku skupinu bez tretmana s ishemijskom skupinom tretiranom taninskom kiselinom, razina superoksid dismutaze (SOD) bila je veća, malondialdehida (MDA) niža, a nuklearnog respiracijskog faktora-1 (NRF-1) veća u skupini tretiranoj s taninskom kiselinom. Histopatološko ispitivanje pokazalo je bolje rezultate u skupini tretiranoj taninskom kiselinom u odnosu na onu koja nije tretirana. Time je u ovom istraživanju pokazano da primjena taninske kiseline ima pozitivno djelovanje na negativne učinke ishemije u tkivu mozga (41). Međutim, taninska kiselina je u ovom istraživanju dana jednokratno te je potrebna dulja primjena da bi se vidjeli njeni učinci tijekom kronične primjene kao što je provedeno u našem istraživanju. Pokazali smo njen negativni učinak na tkivo srca tijekom dulje primjene.

U istraživanju Akomolafe i sur. (2014) pretretman cisplatinu taninskom kiselinom tijekom sedam dana, prema mikrofotografijama, izazvao je znatno oštećenje glomerula i zavijenih kanalića kod životinja koje su dobile 40 mg/kg taninske kiseline (60). Iz toga se može zaključiti da taninska kiselina djeluje negativno na tkivo bubrega što je pokazano u našem istraživanju na mišiću srca.

Nadalje, u istraživanju Turgut Cosan i sur. (2015) štakorima kojima je farmakološki uzrokovana hipertenzija dana je taninska kiselina intraperitonealno, u dozi od 50 mg/kg, tijekom 15 dana. Sama taninska kiselina uzrokovala je pad aktivnosti katalaze u srčanom mišiću, a u kombinaciji s hipertenzijom dodatak taninske kiseline doveo je do značajnog pada aktivnosti katalaze u hemolizatu, što je u skladu s našim istraživanjem kojim smo pokazali negativan učinak taninske kiseline na srčani mišić u kombinaciji s hiperglikemijom (61).

Mašek i sur. (2016) su svojim istraživanjem utvrdili da dodatak taninske kiseline nije poboljšao patološku sliku testisa kod istog modela štakora korištenog u našem istraživanju (40). To pokazuje da taninska kiselina iako nije imala negativan učinak na tkivo testisa nije ni djelovala povoljno, što je također u skladu s tvrdnjom da njeno djelovanje ovisi o tipu stanica.

Koneksini tvore koneksone, odnosno hemikanale ako se nalaze na staničnoj membrani i propusne veze (engl. gap junctions) između dvije stanice te omogućuju razmjenu iona i malih molekula, poput ATP-a, glukoze, NAD<sup>+</sup>, sekundarnih glasnika (npr. cAMP, cGMP), nukleotida, malih peptida i siRNA (44-46). Za srce su značajne tri izoforme, točnije Cx43, Cx40 i Cx45 (52). Njihov značaj i razmještaj se i dalje istražuje.

Cx43 je glavna izoforma u srcu (52). Lokalizacija Cx43 na području prijelaznih ploča (disci intercalares) je dobro poznata, dok se njegova prisutnost u drugim staničnim odjeljcima još uvijek istražuje (55, 56). Našim istraživanjem smo dokazali njegovu prisutnost na području prijelaznih ploča, dok je na drugim područjima njegova imunoreaktivnost bila vrlo slabo ili nikako izražena (slika 6). Međutim, moramo naglasiti da postoji mogućnost da metoda koja je korištena u istraživanju nije dovoljno osjetljiva da bi na drugim područjima dokazali njegovu prisutnost. Nedavno istraživanje je pokazalo da su transportom doksorubicina unutar ekstracelularnih vezikula, koje sadrže Cx43, sačuvana antitumorska svojstva doksorubicina, ali se i djelomično ublažila kardiotoksičnost lijeka (62). Na osnovu toga se može zaključiti da izvanstanične vezikule koje sadrže Cx43 u većoj mjeri komuniciraju s tumorskim stanicama umjesto sa stanicama srca. Postoji mogućnost da tkiva sa smanjenim razinama slobodnog Cx43, kao što je i pokazano našim istraživanjem na tkivu srca, u manjoj mjeri komuniciraju s

vezikulama koje sadrže Cx43. Soares i sur. (2015) su pokazali sličnu ulogu Cx43 u egzosomima (55). Međutim, drugo istraživanje je pokazalo zaštitnu ulogu Cx43 u mitohondrijima na negativne učinke doksorubicina (63). Stoga, daljnja istraživanja su potrebna da bi se dokazala uloga Cx43 te istražio značaj njegovog mogućeg prerasmjesta u tkivu kod različitih patoloških stanja kao što je šećerna bolest (64). Time bi se razjasnila njegova uloga u međustaničnoj komunikaciji.

Našim istraživanjem nije pokazana značajna razlika u izražaju Cx43 u skupini s povišenom razinom glukoze u krvi koja je tretirana taninskom kiselinom u odnosu na druge skupine (slika 7). Stoga ne možemo izvući zaključak o učinku taninske kiseline na razinu Cx43.

Unatoč tomu, taninska kiselina je uzrokovala značajne sklerotične promjene u tkivu srca što se može povezati s njenim drugim učincima na tkivo srca, neovisno o njenom djelovanju na razinu Cx43 u srcu.

Pokazano je da taninska kiselina tvori vodikove i hidrofobne veze s molekulama kolagena te inhibira enzim koji razgrađuje kolagen i time uzrokuje njegovu stabilizaciju (65). S obzirom da je kod šećerne bolesti češći oblik restriksijska kardiomiopatija (17), ovakvo djelovanje taninske kiseline na srce pogoršalo bi morfološke promjene nastale samom hiperglikemijom. Navedeno je u skladu sa sklerotičnim promjenama, odnosno nakupljanjem kolagena koje se može vidjeti na mikrofotografijama skupine tretirane taninskom kiselinom (slika 4). Međutim, treba uzeti u obzir kompleksnu patofiziologiju nastanka dijabetičke kardiomiopatije te još uvijek neistraženo djelovanje taninske kiseline u fiziološkim i patološkim uvjetima.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Oštećenje srca uzrokovano visokom koncentracijom glukoze u krvi i primjenom taninske kiseline u dozi od 0,1% se značajno razlikuje među skupinama.
2. Taninska kiselina zajedno s hiperglikemijom u dozi od 0,1% ne uzrokuje značajan pad ni porast koneksina 43 u srcu.
3. Dodatna istraživanja su potrebna da bi se utvrdila uloga koneksina 43 na drugim područjima, osim prijelaznih ploča.
4. Potrebno je još istraživanja da bi se utvrdila druga djelovanja taninske kiseline, neovisna o njenom antioksidativnom učinku.

## **7. POPIS LITERATURE**

1. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna klinička farmakologija. 11 ed. Nolte MS, editor. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 727-53.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37:S81-90.
3. World Health Day 2016: WHO calls for global action to halt rise in and improve care for people with diabetes [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2016 [citirano 2018 Sep 29]. Dostupno na: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/world-health-day/en/>.
4. IDF diabetes atlas - 8th edition [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation; 2017 [citirano 2018 Sep 29]. Dostupno na: <http://www.diabetesatlas.org/>.
5. Diabetes Symptoms [Internet]. American Diabetes Association. 2018 [citirano 29 Sep 2018]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/symptoms/>.
6. Rahelić D, Albatras V, Bakula M, Balić S, Balint I, Bergman Marković B. Hrvatske smjernice za farmakološko liječenje šećerne bolesti tip 2 [Internet]. Hrvatska, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016 [citirano 2018 Sep 29]. Dostupno na: <http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/HR-smjernice-DM2-2016.pdf>.
7. Gujral U, Mohan V, Pradeepa R, Deepa M, Anjana R, Narayan K. Ethnic differences in the prevalence of diabetes in underweight and normal weight individuals: The CARRS and NHANES studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018;146:34-40.
8. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, i sur. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:3160-7.
9. Complications [Internet]. American Diabetes Association. 2018 [citirano 30 Sep 2018]. Dostupno na: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/>.
10. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care*. 2017;41(Supplement 1):S105-S118.
11. Gregg EW, Gu Q, Cheng YJ, Narayan KM, Cowie CC. Mortality trends in men and women with diabetes, 1971 to 2000. *Ann Intern Med* 2007;147:149-55.
12. Franjic B, Marwick TH. The diabetic, hypertensive heart: epidemiology and mechanisms of a very high-risk situation. *J Hum Hypertens* 2009;23:709-17.
13. Zoungas S, Arima H, Gerstein HC, et al.; Collaborators on Trials of Lowering Glucose (CONTROL) group. Effects of intensive glucose control on microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;5:431-37
14. Nichols GA, Gullion CM, Koro CE, Ephross SA, Brown JB. The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: an update. *Diabetes Care* 2004;27:1879-84.

15. Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, Brown JB. Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care* 2001;24:1614-9.
16. Low Wang C, Hess C, Hiatt W, Goldfine A. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2016;133(24):2459-502.
17. Seferović P, Paulus W. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *European Heart Journal*. 2015;36(27):1718-27.
18. Khan JN, Wilmot EG, Leggate M, Singh A, Yates T, Nimmo M, et al. Subclinical diastolic dysfunction in young adults with Type 2 diabetes mellitus: a multiparametric contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance pilot study assessing potential mechanisms. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2014;15:1263–9.
19. Holland DJ, Marwick TH, Haluska BA, Leano R, Hordern MD, Hare JL, et al. Subclinical LV dysfunction and 10-year outcomes in type 2 diabetes mellitus. *Heart* 2015;101:1061–6.
20. Erqou S, Lee CT, Suffoletto M, Echouffo-Tcheugui JB, de Boer RA, van Melle JP, et al. Association between glycated haemoglobin and the risk of congestive heart failure in diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2013;15:185–93.
21. Jia G, DeMarco V, Sowers J. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;12(3):144-53.
22. Ritchie R, Zerenturk E, Prakoso D, Calkin A. Lipid metabolism and its implications for type 1 diabetes-associated cardiomyopathy. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2017;58(4):225-40.
23. Labombarda F, Leport M, Morello R, Ribault V, Kauffman D, Brouard J et al. Longitudinal left ventricular strain impairment in type 1 diabetes children and adolescents: A 2D speckle strain imaging study. *Diabetes & Metabolism*. 2014;40(4):292-298.
24. Jia G, Hill M, Sowers J. Diabetic Cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2018;122(4):624-38.
25. Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik P, Epstein P. Causes and Characteristics of Diabetic Cardiomyopathy. *The Review of Diabetic Studies*. 2006;3(3):108.
26. Bando YK, Murohara T. Diabetes-related heart failure. *Circ J*. 2014;78:576-83.
27. Short K, Head W, McCaughey M, Piston D. Fluorescence Imaging and Analysis of Blood Flow in Connexin-36 Mouse Pancreatic Islets. *Biophysical Journal*. 2012;102(3):191a.
28. Kraus T, Dahlgren R, Zasoski R. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems-a review. *Plant and Soil*. 2003;256(1):41-66.



29. Chu X, Wang H, Jiang Y, Zhang Y, Bao Y, Zhang X, et al. Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2016;130(1):15-23.
30. Khan N, Ahmad A, Hadi S. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chemico-Biological Interactions*. 2000;125(3):177-89.
31. Holderness J, Hedges J, Daughenbaugh K, Kimmel E, Graff J, Freedman B et al. Response of  $\gamma\delta$  T Cells to Plant-Derived Tannins. *Critical Reviews™ in Immunology*. 2008;28(5):377-402.
32. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan R, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R et al. Tannic acid modulates NF $\kappa$ B signaling pathway and skin inflammation in NC/Nga mice through PPAR $\gamma$  expression. *Cytokine*. 2015;76(2):206-13.
33. Chang T, Wang C. Combination of quercetin and tannic acid in inhibiting 26S proteasome affects S5a and 20S expression, and accumulation of ubiquitin resulted in apoptosis in cancer chemoprevention. *Biological Chemistry*. 2013;394(4).
34. Buzzini P, Arapitsas P, Goretti M, Branda E, Turchetti B, Pinelli P et al. Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008;8(12):1179-87.
35. Winiarska-Mieczan A, Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M, Kiczorowska B, Klebaniuk R, Krusiński R et al. The content of lead and cadmium in fruit-flavoured yoghurts and cream cheeses. *Journal of Elementology*. 2017; 22(4):1333-45.
36. Theisen L, Erdelmeier C, Spoden G, Boukhallouk F, Sausy A, Florin L et al. Tannins from *Hamamelis virginiana* Bark Extract: Characterization and Improvement of the Antiviral Efficacy against Influenza A Virus and Human Papillomavirus. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e88062.
37. Gin H, Rigalleau V, Caubet O, Masquelier J, Aubertin J. Effects of red wine, tannic acid, or ethanol on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetic patients and on starch digestibility in vitro. *Metabolism: clinical and experimental*. 1999;48(9):1179-83.
38. Liu X, Kim JK, Li Y, Li J, Liu F, Chen X. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Nutr* 2005;135:165–71.
39. Labieniec M, Gabryelak T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutat Res*. 2003;539(1-2):127-35.
40. Mašek T, Starčević K. Lipogenesis and lipid peroxidation in rat testes after long-term treatment with sucrose and tannic acid in drinking water. *Andrologia*. 2016;49(4):e12632.
41. Sen H, Ozkan A, Guven M, Akman T, Aras A, Sehitoğlu I et al. Effects of Tannic Acid on the Ischemic Brain Tissue of Rats. *Inflammation*. 2015;38(4):1624-30.

42. Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003;539(1-2):19-28.
43. Bouki E, Dimitriadis V, Kaloyianni M, Dailianis S. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. *Marine Environmental Research*. 2013;85:13-20.
44. SOHL G. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*. 2004;62(2):228-32.
45. Saez JC, Berthoud VM, Banes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiological Reviews*. 2003;83(4):1359-400.
46. Zong L, Zhu Y, Liang R, Zhao H. Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
47. L. Harris A. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2001;34(03).
48. Lampe P, Lau A. Regulation of Gap Junctions by Phosphorylation of Connexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000;384(2):205-15.
49. Oh S, Bargiello T. Voltage Regulation of Connexin Channel Conductance. *Yonsei Medical Journal*. 2015;56(1):1.
50. Retamal M, García I, Pinto B, Pupo A, Báez D, Stehberg J et al. Extracellular Cysteine in Connexins: Role as Redox Sensors. *Frontiers in Physiology*. 2016;7.
51. Desplantez T, Dupont E, Severs N, Weingart R. Gap Junction Channels and Cardiac Impulse Propagation. *Journal of Membrane Biology*. 2007;218(1-3):13-28.
52. Severs N, Bruce A, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovascular Research*. 2008;80(1):9-19.
53. Rhett J, Jourdan J, Gourdie R. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Molecular Biology of the Cell*. 2011;22(9):1516-28.
54. Leo-Macias A, Agullo-Pascual E, Delmar M. The cardiac connexome: non-canonical Functions of connexin43 and their role in cardiac arrhythmias. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;50:13–21.
55. Soares A, Martins-Marques T, Ribeiro-Rodrigues T, Ferreira J, Catarino S, Pinho M et al. Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Scientific Reports*. 2015;5(1).

56. Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2005;67(2):234–44.
57. Reaume A, de Sousa P, Kulkarni S, Langille B, Zhu D, Davies T et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 1995;267(5205):1831-4.
58. Barszcz M, Taciak M, Skomial J. A dose-response effects of tannic acid and protein on growth performance, caecal fermentation, colon morphology, and  $\beta$ -glucuronidase activity of rats. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 2011;20(4):613-625.
59. Hawkins R. Evaluation of Roche Accu-Chek Go and Medisense Optium blood glucose meters. *Clinica Chimica Acta.* 2005;353(1-2):127-131.
60. Akomolafe S, Akinyemi A, Anadozie S. Phenolic Acids (Gallic and Tannic Acids) Modulate Antioxidant Status and Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *International Scholarly Research Notices.* 2014;2014:1-8.
61. Turgut Cosan D, Saydam F, Ozbayer C, Doganer F, Soyocak A, Gunes HV, et al. Impact of tannic acid on blood pressure, oxidative stress and urinary parameters in L-NNA-induced hypertensive rats. *Cytotechnology.* 2015;67(1):97-105.
62. Martins-Marques T, Pinho M, Zuzarte M, Oliveira C, Pereira P, Sluijter J et al. Presence of Cx43 in extracellular vesicles reduces the cardiotoxicity of the anti-tumour therapeutic approach with doxorubicin. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2016;5(1):32538.
63. Pecoraro M, Sorrentino R, Franceschelli S, Del Pizzo M, Pinto A, Popolo A. Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity: Role of Mitochondrial Connexin 43. *Cardiovascular Toxicology.* 2015;15(4):366-76.
64. Lin H, Ogawa K, Imanaga I, Tribulova N. Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2006;290(1-2):69-78.
65. Krishnamoorthy G, Sehgal P, Mandal A, Sadulla S. Studies on collagen-tannic acid-collagenase ternary system: Inhibition of collagenase against collagenolytic degradation of extracellular matrix component of collagen. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2011;27(3):451-7.

## **8. SAŽETAK**

**Naslov:** Utjecaj taninske kiseline na srčani mišić hiperglikemičnih štakora

**Cilj:** Cilj ovog diplomskog je pokazati potencijalni pozitivni ili negativni učinak taninske kiseline na srčani mišić hiperglikemičnih štakora i ekspresiju koneksina 43 upotrebom koncentracije koja je već pokazala korisne učinke.

**Materijal i metode:** U ovom je istraživanju dvanaest muških Wistar štakora podijeljeno u tri skupine na temelju napitaka koje su konzumirali. U svakoj skupini bila su po četiri štakora, a ispitivanje je trajalo dvadeset tjedana. Prva skupina, odnosno kontrolna skupina konzumirala je čistu vodu za piće, a druga skupina 30%-tnu vodenu otopinu saharoze. Treća skupina konzumirala je 30%-tnu vodenu otopinu saharoze i 0,1% taninsku kiselinu. Mjerena im je težina, a koncentracije glukoze u plazmi određivane su s glukometrom. Životinje su eutanazirane te njihova srca su uklonjena. Tkivo je pripremljeno i zatim obojeno trikromnim bojanjem po Mallory-ju. Također je napravljeno imunofluorescencijsko bojanje pa su slikane mikrofotografije. Analizirane su pomoću Adobe Photoshop 7 i Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD) programa. GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, USA) korišten je za statističku analizu.

**Rezultati:** Nakon 20 tjedana eksperimenta, razina glukoze u krvi u skupini koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze značajno je povećana u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,05$ ). Razine glukoze u krvi u skupini štakora koje su dodatno konzumirale taninsku kiselinu (0,1%) manje su povećane. Također je došlo do značajnog smanjenja težine ( $p < 0,05$ ) u toj skupini. Nakon analize ustanovili smo da se oštećenje srca uzrokovano visokom koncentracijom glukoze u krvi i taninskom kiselinom značajno razlikuje među skupinama ( $p < 0,05$ ). Taninska kiselina nije uzrokovala značajno smanjenje ili povećanje ekspresije koneksina 43 u srcu zbog velike varijabilnosti u skupini tretiranoj taninskom kiselinom ( $p < 0,05$ ).

**Zaključak:** Zaključili smo da se oštećenje srčanog mišića značajno razlikuje među skupinama. Taninska kiselina zajedno s hiperglikemijom u dozi od 0,1% ne uzrokuje značajno smanjenje ili povećanje ekspresije koneksina 43 u srcu. Dodatne studije su potrebne za određivanje uloge koneksina 43 u drugim dijelovima srca te su potrebna daljnja istraživanja za određivanje drugih djelovanja taninske kiseline, neovisnih o njenom antioksidativnom učinku.

## **9. SUMMARY**

**Diploma Thesis Title:** The effect of tannic acid on the cardiac muscle of hyperglycemic rats.

**Objectives:** The aim of this thesis is to demonstrate the potential positive or negative effect of the tannic acid on the cardiac muscle of hyperglycemic rats and the expression of the connexins 43 using a concentration that has already shown beneficial effects.

**Material and Methods:** In this trial twelve male Wistar rats were divided into three groups based on beverages they were consuming. There were four rats in each group and Trial lasted twenty weeks. The control group consumed clean drinking water and the second group consumed 30% aqueous sucrose solution. Third group consumed 30% aqueous solution of sucrose and 0,1% tannic acid. They were weighed on electronic balance and their glucose concentrations in plasma were determined with glucometer at the same time. Animals were euthanized and their hearts were removed. The tissue was prepared and then stained by Mallory's trichrome stain. Tissues were also analysed with immunohistochemistry and then microphotographies were taken. Microphotographies were analyzed by Adobe photoshop 7 and Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, USA) was used for statistical analysis.

**Results:** After 20 weeks of experiment blood glucose levels of group that had consumed 30% aqueous solution of sucrose significantly increased compared to the control group ( $p < 0,05$ ). Blood glucose levels in the group of rats that additionally consumed tannic acid (0,1%) blood increased less. Also there was significant weight reduction ( $p < 0,05$ ) in that group. After analysis we found that damages of the heart caused by high blood glucose concentration and consumption of tannic acid were significantly different among the groups ( $p < 0,05$ ). Tannic acid did not caused statistically significant ( $p < 0,05$ ) reduction or increase in the expression of connexins 43 in the heart because of great variability in group that consumed tannic acid.

**Conclusion:** We concluded that heart muscle damage is significantly different among the groups. Tanic acid together with hyperglycemia in a dose of 0.1% does not cause a significant decrease or increase in the expression of connexin 43 in the heart muscle. Additional studies are needed to determine the role of connexin 43 in other parts of the cardiac muscle and further research is needed to determine the other effects of tannic acid regardless of its antioxidant effect.

## **10. ŽIVOTOPIS**



**Osobni podatci:**

**Ime i prezime:** Ivana Bota

**Datum rođenja:** 08. kolovoza 1994.

**Mjesto rođenja:** Sinj, Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Trilj 21240, Tigarica

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

**Obrazovanje:**

**2013. – 2018.** Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

**2009. – 2013.** Opća gimnazija "Dinko Šimunović", Sinj

**2001. – 2009.** Osnovna škola "Stjepan Radić", Tigarica

**Radno iskustvo:**

**3.2018. – 9.2018.** Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna „Plokite“.

**Nagrade i priznanja:** Dekanova nagrada Medicinskog fakulteta u Splitu (2017.).

**Rad na računalu i programima:** MS Office, Eskulap 2000, Adobe Photoshop, ImageJ

**Strani jezik:** Engleski jezik (B2 razina), francuski jezik (A2 razina).