Srčana inervacija u štakora s dijabetesom tipa I izazvanim streptozocinom

Baković, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:197074

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Baković

SRČANA INERVACIJA U ŠTAKORA S DIJABETESOM TIPA I IZAZVANIM STREPTOZOCINOM

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentorica:

Izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

U Splitu, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Baković

SRČANA INERVACIJA U ŠTAKORA S DIJABETESOM TIPA I IZAZVANIM STREPTOZOCINOM

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentorica:

Izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

U Splitu, 2018.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Katarini Vukojević što je na svakom koraku izrade ove doktorske disertacije bila i učitelj i prijatelj, hvala na svom znanju koje ste mi prenijeli, na svim ohrabrenjima, nesebičnoj pomoći, trudu i razumijevanju. Hvala Vam što ste mi bili uzor u predanom radu i ustrajnosti, što ste mi prenijeli ljubav prema znanosti. Hvala Vam što ste imali vjere u mene i bili uz mene na svakom koraku ovoga puta proteklih godina. Bila mi je čast što sam imala priliku učiti od Vas i raditi sa Vama. Hvala!

Zahvaljujem doc. dr. sc. Nataliji Filipović na stručnoj i nesebičnoj pomoći od mog prvog susreta sa znanošću. Hvala usmjeravanjima, savjetima, prenesenom znanju i podršci!

Također zahvaljujem svim kolegama Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, posebice prof. dr.sc. Liviji Puljak na nesebičnoj pomoći i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije, kao i dr. sc. Lejli Ferhatović Hamzić na pomoći pri izvođenju eksperimenta i sakupljanju uzoraka.

Posebna zahvala mojoj obitelji kojoj posvećujem ovu doktorsku disertaciju, Frani, Sofiji i Mirku, mojim sestrama, teti, i najviše mojim roditeljima koji su podrška na svim mojim životnim putevima. Hvala na svoj ljubavi i strpljenju!

SADRŽAJ

1.UVOD.....1

1.1. Simpatička inervacija srca.....1

1.2. Parasimpatička inervacija srca.....1

1.3. Osjetna inervacija srca.....1

1.4. Organizacija inervacije srca.....2

1.4.1. Središnja inervacija srca.....2

1.4.2. Intratorakalna organizacija autonomne inervacije srca.....2

1.4.3. Intrinzični subepikardijalni gangliji.....3

1.4.4. Provodni sustav srca.....4

1.4.5. Raspodjela autonomne inervacije u srcu.....4

1.5. Šećerna bolest.....6

1.5.1. Tipovi šećerne bolesti.....6

1.5.2. Šećerna bolest tipa 1 (DM1).....6

1.5.3. Šećerna bolest tipa 2 (DM2).....7

1.5.4 Gestacijski dijabetes.....7

1.5.5 MODY.....7

1.5.6. Intolerancija glukoze.....7

1.6. Komplikacije hiperglikemije.....8

1.6.1. Dijabetička neuropatija.....8

1.6.1.1. Morfološke i funkcionalne karakteristike dijabetičke neropatije.....12

1.7. Utjecaj šećerne bolesti na autonomnu inervaciju srca.....10

1.7.1 Promjena simpatičke inervacije srca kod šećerne bolesti.....13

1.7.2 Promjena parasimpatičke inervacije srca kod šećerne bolesti.....15

1.7.3 Promjena osjetne inervacije srca kod šećerne bolesti.....15

1.8. Dijabetička kardiomiopatija.....16

1.9. Dijabetička autonimna neuropatija u drugim organskim sustavima.....18

1.9.1 Probavni sustav.....18

1.9.2 Sudomotor.....19
1.9.3 Mokraćni mjehur.....19
1.10. Eksperimentalni model šećerne bolesti.....19
1.11. Imunohistokemijski biljezi.....20
1.11.1 PGP9.5.....20
1.11.2 Tirozin hidroksilaza.....21
1.11.3 Neurofilament 200.....21
2. CILJEVI I HIPOTEZE.....22
2.1. Ciljevi.....22
2.2. Hipoteze.....23
3. MATERIJALI I METODE.....24
3.1. Etičko odobrenje.....24
3.2. Pokusne životinje.....24
3.3. Indukcija i utvrđivanje šećerne bolesti.....24
3.4. Prikupljanje i priprema tkiva.....25
3.5. Imunohistokemijsko bojanje i mikroskopska obrada.....25
3.6. Analiza slika i kvantifikacija.....26
3.7. Priprema rezova za utvrđivanje kardiomiopatije.....27
3.8. Statistička analiza.....28
3.8.1. Izračun veličine uzorka.....28
3.8.2. Statistički postupci.....29
4. REZULTATI.....30
4.1. Utvrđivanje šećerne bolesti.....30
4.2. Usporedba PGP9.5 pozitivnih vlakana u dijabetičkoj i kontrolonoj skupini 31
4.3. Usporedba PGP9.5 pozitivnih vlakana u različitim regijama klijetke dijabetičkih i kontrolnih skupina.....32
4.4. Usporedba NF200 pozitivnih vlakana u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini.....35

4.5. Usporedba NF200 pozitivnih vlakana u različitim regijama klijetke dijabetičkih i kontrolnih životinja.....37

4.6. Usporedba TH pozitivnh vlakana u dijabetičkih i kontrolnih životinja.....38

4.7. Usporedba TH pozitivnih vlakana u različitim regijama klijetke dijabetičkih i kontrolnih životinja.....39

4.8. Promjene PGP9.5, NF200 i TH pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja kod šećerne bolesti.....42

4.9. Promjene PGP9.5, NF200 i TH pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u kontrolnim skupinama.....42

4.10. Promjene PGP9.5 pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u kontrolnim skupinama.....43

4.11. Promjene PGP9.5 pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u dijabetičkim skupinama....43

4.12. Promjene TH pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u kontrolnim skupinama.....43

4.13. Promjene TH pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u dijabetičkim skupinama.....43

4.14. Promjene NF200 pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u kontrolnim skupinama.....44

4.15.Promjene NF200 pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u dijabetičkim skupinama.....44

4.16. Validacija kardiomiopatije.....44

5. RASPRAVA.....46

6. ZAKLJUČCI.....55

7. SAŽETAK.....56

8. SUMMARY.....57

9. LITERATURA.....58

10. ŽIVOTOPIS.....73

POPIS OZNAKA I KRATICA

DM	šećerna bolest (*engl. diabetes mellitus*)
DM1	šećerna bolest tipa 1 (*engl. diabetes mellitus type I*)
DM2	šećerna bolest tipa 2 (*engl. diabetes mellitus type II*)
GUK	glukoza u krvi
DAN	Dijabetička autonomna neuropatija (*engl. diabetic autonomic neuropathy*)
CAN	Srčana autonomna neuropatija (*engl. cardiac autonomic neuropathy*)
EKG	Elektrokardiograf
NE	Norepinefrin
CGRP	Kalcitonin gen vezani peptid (*engl. Calcitonine gene related peptide*)
NPY	Neuropeptid Y
SP	Supstanca P
STZ	Streptozotocin
PGP9.5	Protein gen vezani peptid 9.5 (*engl. Protein gene related peptide 9.5*)
NF200	Neurofilament 200 kD
TH	Tirozin hidroksilaza (*engl. tyrosine hydroxilase*)
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin (*engl. L-3,4-dihydroxyphenylalanine*)
SŽS	središnji živčani sustav
IB4	izolektin B4
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid, DNA*)

AGE	konačni produkti glikacije (*engl. Advanced glycation end products*)
MK	masne kiseline (*engl. fatty acid*)
WHO/SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization*)
LP/LA	lijeva pretklijetka (*engl. left atrium*)
DP/RA	desna pretklijetka (*engl. right atrium*)
LK/LV	lijeva klijetka (*engl. left ventricle*)
DK/RV	desna klijetka (*engl. right ventricle*)
H&E	Hemalaun i eozin (*engl. Hematoxylin and Eosin*)
SA čvor	sinus-atrijski čvor
AV čvor	atrioventrikularni čvor
ChAT	kolin acetil transferaza (*engl. choline acetyltransferase*)
HLA	Humani leukocitni antigeni (*engl. human leukocye antigen*)
ICA	protutijela na Langerhansove otočiće (*engl. islet cell autoantigen*)
GAD	dekarboksilaza glutaminske kiseline (*engl. glutamic acid decarboxlylase*)
IAA	protutijela na endogeni inzulin (*engl. insulin autoantibody*)
MODY	adultni dijabetes mladih (*engl. maturity onset diabetes of the young*)
NGF	neuralni čimbenik rasta (*engl. neural growth factor*)
Sem3a	semaforin III. razreda (*engl. Class 3 secreted semaphorin*)
AGEs	produkti uznapredovale glikacije (*engl.advanced glycation end products*)
RAGE	receptori za produkte uznapredovale glikacije (*engl. receptor for advanced glycation end products*)
PCK	protein kinaze C
DAG	diacilglicerola

TGFβ	transformirajući faktor rasta β (*engl. transforming growth factor beta*)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (*engl. vascular endothelial growth factor*)
GlcNac	Uridin- 5-dipfosfat N-acetilglukozamin
ROS	reaktivni metaboliti kisika (*engl. reactive oxygen species*)
NT-3	neurotrofina 3
PARP	poli ADP-riboza polimeraza-1 (*engl. poly(ADP-ribose) polymerase-1*)
MPAK	mitogen aktivirana protein kinaza (*engl. mitogen activated protein kinase*)
TNFα	tumorski faktor α (*engl. tumor necrosis factor- α*)
IGF	inzulinu sličan faktor rasta (*engl. insulin like growth factor*)
NGF	neuralni faktor rasta (*engl. neural growth factor*)
SS	Schwanove stanice
GLUT-1	transporter glukoze 1 (*eng. glucose transporter 1*)
IRS	supstrati inzulinskog recptora (*engl. insulin receptor substrates, IRS*)
JNK	(*engl. c-Jun N-terminal Kinase*)

1. UVOD

Živčani sustav se sastoji od središnjeg i perifernog živčanog sustava. Središnji živčani sustav (SŽS) sačinjava mozak (veliki, mali mozak i produljena moždina) i kralježnična moždina. Funkcijski se dijeli na autonomni (simpatikus i parasimpatikus) i somatski sustav. Aksoni koji opskrbljuju ciljna tkiva mogu biti eferentna i aferentna. Eferentna vlakna prenose informacije iz središta na periferiju, dok aferentna prenose s periferije do SŽS-a.

1.1.Simpatička inervacija srca

Tijela simpatičkih preganglijskih neurona su smještena u intermediolateralnoj kolumni kralježničke moždine od T1-T5 segmenta. Preganglijska simpatička vlakna putuju do *truncus sympathicusa*, odnosno paravertebralnih simpatičkih ganglija, gdje se prespajaju. Najčešće su to srednji cervikalni i stelatni ganglij, te kao postsinaptička vlakna direktno šalju informacije neuritima do srca. Paravertebralni simpatički gangliji sadrže i tijela simpatičkih neurona, čiji aksoni se prespajaju u intrinzičnom pleksusu srca odnosno subepikardijalnim ganglijima (1, 2).

1.2. Parasimpatička inervacija srca

Parasimpatička preganglijska eferentna vlakna projekcije su jezgara X. kranijalnoga živca. Tijela parasimpatičkih preganglijskih neurona smještena su unutar moždanog debla, poglavito u nucleus ambiguus, dok je jedan mali dio smješten i u nucleus dorsalis nervi vagi. Preganglijska vlakna idu direktno do srca, gdje se prespajaju u intrinzičnim ganglijima (1, 2).

1.3. Osjetna inervacija srca

Aferentna autonomna vlakna šalju informacije o mehaničkim, kemijskim i nociceptivnim podražajima srca u viša središta. Osjetni neuroni srca su pseudounipolarni. Tijela osjetnih neurona srca su smještena u nodoznom gangliju, proksimalno vlakno ide centralno do nucleus tractus solirarii i nucleus dorsalis n. vagi, dok periferno vlakno putuje zajedno sa n. vagusom do srca i drugih ciljnih tkiva (3). Dijelu aferentnih aksona srca tijela neurona se nalaze u spinalnim ganglijima, proksimalni nastavak ide do stražnjih rogova kralježničke moždine C6 do Th6, a distalni dio do srca (4).

1.4. Organizacija inervacije srca

Inervacija srca je autonomna, pod utjecajem je simpatikusa i parasimpatikusa, kao i autonomnih osjetnih vlakana. Prema novijim istraživanjima, hijerarhijski je podijeljena središnju inervaciju srca, intratorakalni i intrinzični sustav (5).

1.4.1. Središnja inervacija srca

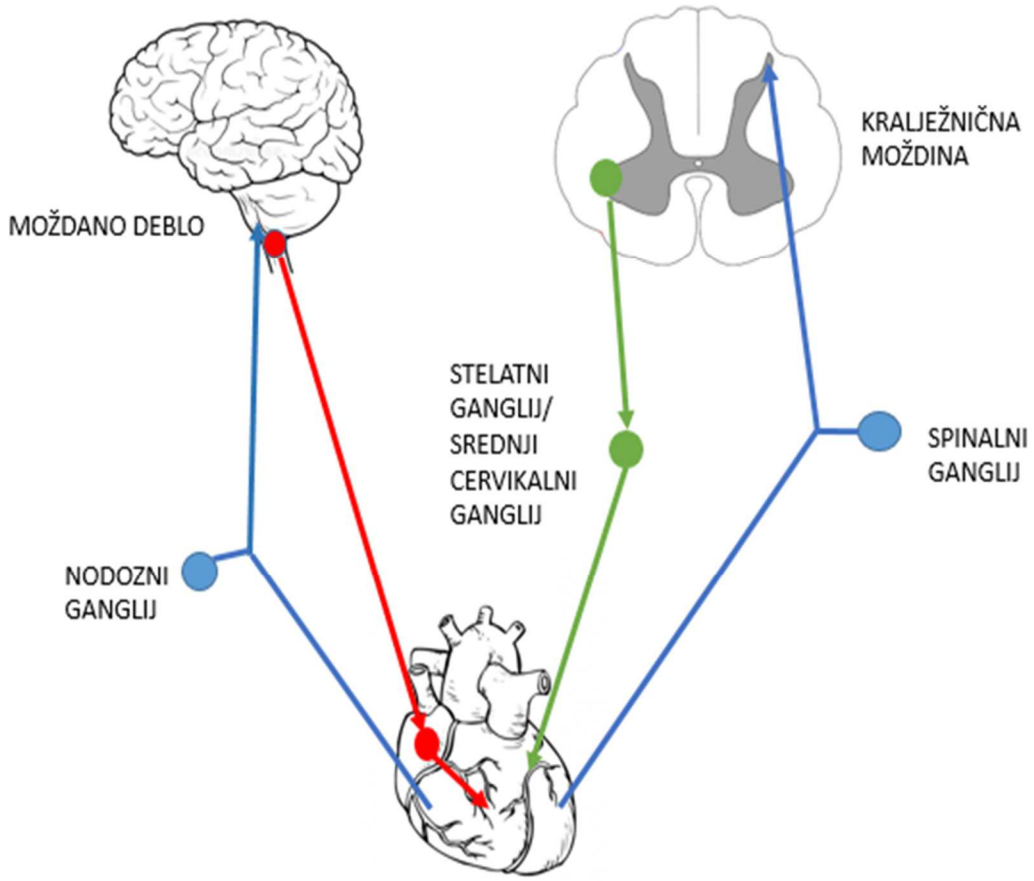
Središnja inervacija srca uključuje sastavnice simpatičke, parasimpatičke i osjetne inervacije koje potječu iz središnjeg živčanog sustava, gdje se nalaze tijela njihovih neurona. Za simpatikus je to intermediolateralna kolumna, za parasimpatikus jezgre X. moždanog živca u moždanom deblu, poglavito nucleus ambiguus, dok je jedan mali dio smješten i u nucleus dorsalis nervi vagi. Tijela neurona osjetne inervacije srca u središnjem živčanom sustavu su u jezgrama nucleus tractus solirarii i nucleus dorsalis n. vagi u moždanom deblu i stražnjim rogovima kralježnične moždine.

1.4.2. Intratorakalna organizacija autonomne inervacije srca

Prema novijim istraživanjima precizan rad srca uz kontrolu središnjeg živčanog sustava uvelike uvjetuje koordinacija aktivnosti neurona intratorakalnih ganglija (2). Njihov rad je odgovor na obradu podataka koje dobiju iz središnjeg živčanog sustava (SŽS), lokalnih aferentnih vlakana, kao i neurohumoralnom okruženju cirkulirajućih hormona (6). Intratorakalni autonomni gangliji sadrže aferentna i eferentna vlakna, kao i vlakna lokalnog kružnog puta kojima šalju informacije. *Truncus sympathicus*, poglavito srednji cervikalni i stelatni ganglij, su intratoraklno mjesto prekapčanja simpatičkih vlakana. Aferentna vlakna intratorakalnih ganglija prenose informacije o mehaničkom i kemijskom podražaju iz klijetki, pretklijetki, karotidnih arterija i luka aorte do SŽS, poglavito hipotalamusa (7). Taj prinos aferentnih informacija pomaže održavanju funkcije eferentnih vlakana i rada srca kod dugoročne decentralizacije intratorakalnog sustava (5). Intratorakalni dio inervacije srca ne sadrži parasimpatičku komponentu, nego presinaptička vlakna idu do intrinzičnog pleksusa (2). Intratorakalna inervacija srca uključuje i lokalne kružne neurone koji usklađuju informacije iz istog kao i između pojedinih ganglija. Smatra se da je njihova funkcija koordinacija neurohumoralnih informacija koje utječu na rad srca (2).

1.4.3. Intrinzični subepikardijalni gangliji

Intrinzični srčani gangliji sadrže postsinaptičke neurone parasimpatikusa koji su većinom smješteni oko sinus-atrijskog čvora, u stražnjem dijelu obje pretklijetke, oko izlaznih dijelova klijetki, te gornje i donje šuplje vene (1). Intrinzični gangliji također sadrže tijela simpatičkih, interneurona, kao i osjetnih neurona. Oni zajedno tvore mrežu u kojoj dolazi do završne koordinacije informacija zajedno sa onima iz viših središta, po kojoj simpatikus i parasimpatikus u konačnici korigiraju aktivnost srca, kako u zdravom stanju, tako i promijenjenim uvjetima (5).



Slika 1. Shematski prikaz inervacije srca. Parasimpatička vlakna su označena crvenom bojom, čiji su neuroni smješteni u moždanom deblu, zelena boja označava simpatička vlakna, čiji su neuroni smješteni u intermediolateralnoj kolumni kralježničke moždine, dok plava boja označava pseudounipolarna aferentna vlakna, čiji su neuroni smješteni u nodoznom i spinalnom gangliju.

1.4.4. Provodni sustav srca

Provodni sustav srca je inervacijski sustav zadužen za veoma precizno širenje akcijskog potencijala kardiomiocitima, kako bi ih u točno zadano vrijeme potaknuo na kontrakciju. Pod kontrolom je simpatikusa i parasimpatikusa. Sastoji se od sinus-atrijskog čvora (SA čvor), koji je internodalnim vlaknima povezan sa atrioventrikularnim čvorom (AV čvor). Od AV čvora vlakna dolaze Hisovim snopom, koji se dijeli u inetrventrikularnom septumu na lijevu i desnu granu. Potom se nastavlja u Purkinjeova vlakna koja su raspršena po subendokradu klijetki (8).

1.4.5. Raspodjela autonomne inervacije u srcu

Raspodjela simpatičke inervacije u srcu

Simpatička vlakna su brojnija u klijetkama od parasimpatičkih vlakana, dok je u pretklijetkama odnos obrnut. Simpatikus ima predominaciju u prednjoj stijenki, naspram parasimpatikusa (9), dok je promatrajući samo simpatička vlakna, utvrđena veća gustoća u prednjoj stijenki klijetki, naspram stražnje (10). Yokoyama je sa suradnicima vizualizirao kako se simpatička vlakna rasprostiru epikardom, potom se granaju u miokard, te se lociraju većinom oko koronarnih krvnih žila (11).

Raspodjela parasimpatičke inervacije u srcu

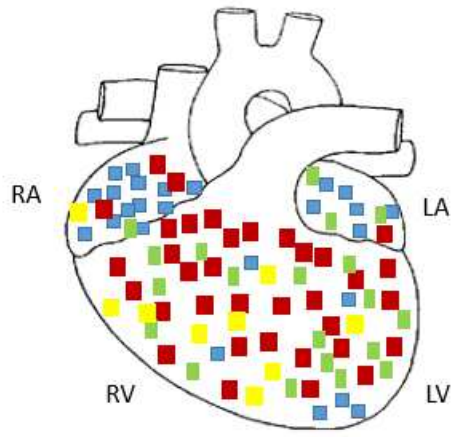
Parasimpatička vlakna u srcu, proučavana većinom pomoću ChAT biljega (*engl. choline acetyltransferase*) na ljudskim srcima, u prednjoj i stražnjoj stijenci desne pretkljetke čine 56% svih vlakana, dok su najgušće raspoređena u prednjoj stijenci lijeve pretklijetke, potom u sinus-atrijskom čvoru (SA čvor). Iako su tanja od simpatičkih vlakana, dominiraju gustoćom u pretklijetkama (12). Studije na klijetkama zečeva pokazale su da parasimpatičkih ChAT pozitivnih vlakana u klijetkama ima veoma malo, podjednako u lijevoj i desnoj klijetci, te da ih nešto manje ima apikalno, dok su u najmanjem broju pronađena u bazalnom djelu klijetki. Značajno više ih ima u epikardu u odnosu na miokard (13). Studije na srcima štakora potvrđuju ove rezultate, kod njih je također pronađena veća gustoća ChAT pozitivnih vlakana u pretklijetkama, poglavito desnoj, dok je u klijetkama veoma malen broj ChAT pozitivnih vlakana (14, 15). ChAT pozitivna vlakna su, naprotiv, veoma brojna u provodnom sustavu srca, poglavito oko AV čvora i SA čvora, kao i u intrinzičkoj inervaciji srca (13, 15).

Raspodjela osjetne inervacije u srcu

Kad je riječ o osjetnoj inervaciji srca razlikujemo aferentna vlakna nodoznog ganglija i aferentna vlakna spinalnih ganglija, no i među tim vlaknima postoje pojedine razlike u distribuciji ovisno o njihovim neurokemijskim osobitostima. Osjetna inervacija je većinom detektirana pomoću biljega Izolektin B, kalretinin i Neurofilament 200.

Aksoni spinalnih ganglija se u većem broju mogu pronaći u klijetkama nego u pretklijetkama. Izolektin B (IB4) pozitivna vlakna spinalnih ganglija su podjednako raspoređena u klijetkama i pretklijetkama, dok Neurofilament 200 pozitivna vlakna spinalnih ganglija dominiraju u lijevoj strani srca, a kalretinin pozitivna u lijevoj pretklijetci (4).

Aferentna vlakna nodoznog ganglija također su pokazala razlike u lokalizaciji ovisno o neurokemijskim svojstvima. Neurofilament 200 pozitivna vlakna nodoznog ganglija većinom su lokalizirana u lijevoj klijetci, dok Izolektin B dominira u desnoj strani srca, a kalretinin pozitivna vlakna se većinom nalaze u klijetkama u odnosu na pretklijetke (16).



Slika 2. Shematski prikaz raspodjele pojednih vrsta vlakana u miokardu; distribucija parasimpatičkh vlakana označena je zelenom bojom, simpatičkih crvenom bojom, osjetna vlakna nodoznog ganglija označana su žutom bojom, spinalnih ganglija zelenom bojom; RA desna pretklijetka, LA lijeva pretklijetka, RV desna klijetka, LV lijeva klijetka.

1.5. Šećerna bolest (*engl. diabetes mellitus, DM*)

Šećerna bolest (Diabetes mellitus, DM) je jedna od najčešćih kroničnih metaboličkih bolesti današnjice, čija prevalencija bilježi porast u cijelom svijetu. Prema podacima SZO iz 2016. godine od nje boluje 422 milijuna ljudi diljem svijeta (17). Karakterizira je hiperglikemija, praćena poremećajem metabolizma ugljikohidrata, bjelančevina i masti (18). Kriteriji za dijagnozu šećerne bolesti su vrijednosti glukoze natašte iznad 7,1 mmol/L (nakon 8 sati bez unosa kalorija) ili slučajan nalaz glukoze u krvi (GUK) iznad 11,1 mmol/L, odnosno 2 sata poslije testa opterećenja glukozom (OGTT, uzimanje 75 g glukoze) uz prisutne klasične simptome, a to su za DM1 poliurija, polidipsija i polifagija, uz gubljenje na težini i osjećaj umora, a za DM2 pojava kroničnih komplikacija kao što su retinopatija, neuropatija, nefropatija i mikroangiopatija (18, 19).

1.5.1. Tipovi šećerne bolesti

Razlikujemo nekoliko tipova šećerne bolesti prema SZO (19):

1. Šećerna bolest tipa 1 (tip 1, DM1),
2. Šećerna bolest tipa 2 (tip 2, DM2),
3. Gestacijski dijabetes,
4. MODY (engl. maturity onset diabetes of the young), heterogena skupina, različitih uzroka bolesti
5. Intolerancija glukoze

1.5.2. Šećerna bolest tipa 1 (DM1)

Pojavljuje se češće u mladih ljudi (do 30 godina), autoimuna je bolest, kod koje je glavni mehanizam nastanka uništenje β stanica gušterače koje proizvode inzulin, zbog čega je u liječenju nužna primjena inzulina, stoga se ovaj tip naziva i inzulin ovisna šećerna bolest (20). Za nastanak DM1, uz okolišne čimbenike, ključni su i nasljedni čimbenici. Humani leukocitni antigeni (engl. human leukocye antigen, HLA) se smatraju najvažnijim antigenima u nasljeđivanju, posebice razred DR3/ DR4, no postoje još druge brojne kromosomske regije koje se dovode u vezu sa nastankom DM1, a tek su predmet istraživanja (21, 22). U samom mehanizmu nastanka DM1 sudjeluju protutijela na Langerhansove otočiće (engl. islet cell autoantigen, ICA), protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. glutamic acid decarboxlylase, GAD), protutijela na endogeni inzulin (engl. insulin autoantibody, IAA) (23).

Navedeni faktori dovode do nedovoljne razne inzulina i visokih vrijednosti GUK-a, zbog čega su kod ovog tipa bolesti prvi znaci poliurija, polidipsija, polifagija, umor i gubitak težine (19).

1.5.3. Šećerna bolest tipa 2 (DM2)

Šećerna bolest tipa 2 naziva se inzulin neovisna šećerna bolest. Pojavljuje se tek u odrasloj dobi. Ranije se dobna granica za nastanak šećerne bolesti tipa 2 držala iznad 50 godina, no danas se sve češće pojavljuje i puno ranije, čak i kod djece i adolescenata, zbog sve učestalije pretilosti, sjedilačkog načina života i nepravilne prehrane (24). Smatra se da uz genske čimbenike dominiraju pretilost, nedovoljno tjelovježbe, hiperlipidemija, starija dob. Bolest je karakterizirana rezistencijom perifernih tkiva na inzulin. Iako u samom početku bolesti dolazi do povećane produkcije inzulina, vremenom se broj inzulinskih receptora na stanicama smanjuje, te je onemogućen unos glukoze u stanice. Za liječenje DM2 se uz oralne antidijabetike preporuča promjena prehrambenih navika i tjelovježba. Često se u liječenju DM2 koristi i inzulin (18).

1.5.4. Gestacijski dijabetes

Javlja se u trudnoći i najčešće spontano prolazi nakon poroda. Otkriva se rutinskom prenatalnom obradom. Dijetna prehrana se najčešće koristi kao mjera liječenja, tek ukoliko promjene prehrambenih navika ne daju zadovoljavajuće rezultate, započinje se farmakološko liječenje (25).

1.5.5. MODY

Javlja se obično između 15. i 25. godine, najčešće se opisuje 5 tipova, od kojih je MODY 2 najčešći, nastaje zbog mutacije gena glukokinaze, koja pomaže metabolizam glukoze u jetri (21).

1.5.6. Intolerancija glukoze

Novija dijagnostička kategorija, definirana je kao vrijednost GUK-a u OGTT-testu dva sata nakon opterećenja sa 75 grama glukoze između 7,8 i 11,1 mmol/L (18, 26).

1.6. Komplikacije hiperglikemije

Brojne su komplikacije koje uzrokuje povećana razina glukoze u krvi. Dijelimo ih na akutne i kronične. Akutne komplikacije su životno ugrožavajuća hitna stanja koja zahtijevaju žurno liječenje, a to su dijabetička ketoacidoza, hiperosmolarno neketotičko stanje, hipoglikemija i

acidoza mliječnom kiselinom. Kronične komplikacije su učestale, veliki su javnozdravstveni problem u svijetu zbog morbiditeta i mortaliteta koje se s njima povezuju. U kronične komplikacije spadaju dijabetička mikroangiopatija, odnosno dijabetička retinopatija, dijabetička nefropatija, dijabetička neuropatija, koje se navode kao njene posljedice, te dijabetička makroangiopatija i dijabetičko stopalo kao zasebna komplikacija DM-a (27, 28).

1.6.1. Dijabetička neuropatija

Dijabetička neuropatija (DN) je jedna od najčešćih komplikacija šećerne bolesti, ujedno i najčešća neuropatija (29). Oštećenja se javljaju kod osjetnih, motoričkih i autonomnih živaca. Procjenjuje se da 25 godina nakon dijagnoze DM-a čak 50% oboljelih ima DN, dok bi taj broj porastao do 90% ukoliko bi se pribrojali i oni sa subkliničkim simptomima (30). Mehanizam nastanka DN-e nije u potpunosti razjašnjen. Smatra da je u patogenezu uključeno više različitih mehanizama. Osnovnih pet su sorbitolski put, stvaranje AGE, aktivacija PCK, stvaranje heksozamina i aktivacija PARP, koji su usko povezani sa stvaranjem oksidativnog stresa i upalnih faktora. Promjena razine inzulina i aktivnost inzulinskih receptora, oštećenje vasa nervorum kao i promjene Schwanovih stanica, također igraju veliku ulogu u nastanku dijabetičke neuropatije.

Najčešće spominjani mehanizam nastanka DN-e je sorbitolski put, koji je karakterističan za tkiva koja nisu ovisna o inzulinu, kao što je i živčano tkivo. Sorbitolski put uključuje nekoliko koraka kojima bi oštećenja mogla nastati. Aldoza reduktaza (AR) kao prvi enzim u sorbitolskom putu reducira sorbitol iz glukoze. Unatoč tome što sorbitol dehidrogenaza razgrađuje sorbitol, zbog povećanog stvaranja dolazi do nakupljanja sorbitola i fruktoze u stanicama zbog čega dolazi do ulaska vode u stanicu, njenog bubrenja i oštećenja. Istodobno mioinozitol izlazi iz stanice zbog održanja osmotske ravnoteže, a time slabi aktivnost Na/K ATP-aze, što oštećuje i funkciju aksona, usporavajući provodnost impulsa (31). Smatra se da se u navedenim reakcijama događa još jedan ključan korak u oštećenju aksona. Aldoza reduktaza može izravno oksidirati aldehide, ketone, monosaharide i druge supstrate, ali i iscrpljuje stanični NADPH koji je potreban za regeneraciju antioksidansa glutationa, čime dovodi do pojačanog stvaranja reaktivnih metabolita kisika (32). Inhibicija aldoza reduktaze, kao jednog od ključnih medijatora oštećenja perifernih živaca, bilo utjecajem na stvaranje reaktivnih metabolita kisika ili sorbitola, također je predmet brojnih istraživanja. Studije izvedene na transgeničnim miševima su pokazale da miševi bez AR nisu imali jednako velika oštećenja perifernih živaca kod šećerne bolesti, kao miševi sa AR (33). Također, kod miševa

koji su liječeni inhibitorima AR oštećenja perifernih živaca su bila manja naspram miševa sa aktivnom AR (33). Istraživanja inhibitora aldoza reduktaze na eksperimentalnim životinjama su bila obećavajuća, stoga su provedene brojne kliničke studije, ispitivano je desetak različitih spojeva, no nisu dala dobre rezultate, te se inhibitori AR još uvijek ne koriste u kliničkoj praksi (34, 35).

Kronična oštećenja ciljnih tkiva kod DM-a se stvaraju i glikacijom bjelančevina, gdje se glukoza zbog viškova koji se nalaze u krvi spontano veže za razne bjelančevine, čime remeti brojne enzimske procese. Smatra se da je ovaj proces isprva reverzibilan, no trajanjem hiperglikemije ireverzibilno se stvaraju veliki glikolizirani kompleksi proteina, produkti uznapredovale glikacije (*engl. advanced glycation end products, AGEs*), koji se vežu na specifične receptore RAGE (*engl. receptor for advanced glycation end products*), čime potiču stvaranje upalnih reakcija, vazokonstrikciju te remodeliranje ciljnih tkiva kod šećerne bolesti (34, 36).

Aktivacija protein kinaze C (PCK) je također dobro proučen put nastanka oštećenja pod utjecajem hiperglikemije. Aktivira se pod utjecajem DAG-a (diacilglicerola) koji se tijekom glikolize stvara iz dihidroksi-aceton fosfata (37). PCK ima nekoliko izoformi koje utječu na permeabilnost stanice, sintezu ekstracelularnog matriksa, stanični rast i apoptozu, aktivaciju i inhibiciju citokina, angiogenezu (38). Povezuje se sa nastankom retinopatije, nefropatije, kardiomiopatije i ateroskleroze promjenom funkcije N/K ATP-aze, promjene ekspresije gena za faktore rasta među kojima su TGFβ (engl. transforming growth factor beta) i VEGF (engl. vascular endothelial growth factor), stvarajući hipoksiju i vazokonstrikciju (34). Smatra se da igra važnu ulogu i u neuropatiji, poglavito promjenom funkcije Na/K ATP-aze, što je dokazano na štakorskom modelu dijabetesa (38). Inhibitori PCK-e su na eksperimentalnim modelima DM pokazali neuroprotektivan učinak, dok u kliničkim istraživanjima nisu dali značajne rezultate (30).

Uridin- 5-difosfat N-acetilglukozamin (GlcNac) je jedan od produkata glikolize. Smatra se da stvara lipidnu neravnotežu i potiče upalu u perifernim živcima, aktivirajući faktore transkripcije (34).

Navedeni mehanizmi oštećenja kod DM-a vode stvaranju oksidativnog stresa i upalnih reakcija. Do oksidativnog stresa dolazi kod pojačanog stvaranja reaktivnih metabolita kisika (engl. reactive oxygen species, ROS). ROS su molekule koje sadrže kisik, a zbog nesparenog elektrona kojeg sadrže, smatraju se slobodnim radikalima. U promjenjenim uvjetima unutar

stanice zbog ranije navedenih mehanizama dolazi do pojačanog stvaranja ROS-a, odnosno manjka antioksidansa. ROS potom oksidiraju DNK, proteine, ugljikohidrate i lipide i stvaraju oksidativni stres, koji je karakteriziran oštećenjem mitohondrija, stanice, potom dovodi i do apoptoze (39, 40). Upravo oksidativna ošećenja mitohondrija se navode kao jedan od centralnih događaja u razvoju dijabetičke neuropatije. ROS oštećuju mitohondrijsku DNK, čime se onemogućuje adekvatno održanje funkcije stanice (41). Mitohondrijski posredovana stanična smrt se također odvija aktivacijom endonukleaze, oslobađanjima citokroma C, aktivacijom kaspaze 3, te slabom energetskom opskrbom zbog oslabljene produkcije ATP-a. Redukija neurotrofina 3 (NT-3) i NGF-a kao neurotrofičkih faktora se također javlja kod oštećenja mitohondrija (30). Terapijska uloga antioksidansa je predmet istraživanja, a uz glutation snažni stanični antioksidansi su i superoksid dizmutaza i katalaza (42). α- lipoična kiselina bi mogla djelovati na spriječavanje oksidativnog stresa, te se istražuju njene terapijske mogućnosti (30).

Oksidativni stres inducira aktivaciju jezgrinog enzima PARP-a (*engl. poly(ADP-ribose) polymerase-1*), koji usporava glikolizu, transport elektrona i stvaranje ATP-a. Uz to, ima ulogu u detekciji oštećenja DNK, aktivaciji transkripcije upalnih faktora i NF-κB, te se povezuje sa izazivanjem apoptoze. Smatra se da je aktivacija PARP-a izravno povezana sa oštećenjima endoltela krvnih žila, poglavito velikih krvnih žila kod šečerne bolesti, ali i nastankom dijabetičke retinopatije i nefropatije putem oštećenja mikrocirkulacije (43). Uloga aktivacije PARP-a u razvoju dijabetičke neuropatije nije još do kraja razjašnjena, no dokazano je da inhibitori PARP-a povoljno djeluju na brzinu provođenja impulsa. Smatra se da je to zbog utjecaja na endoneuralni protok krvi i razine fosfokreatinina (44, 45). Također, blokiranjem aktivnosti PARP-a, sprječava se aktivacija izoformi PCK, AGE i heksozamninskog puta oštećenja, te ispituju terapijske mogućnosti inhibitora PARP-a (43).

Upalne rakcije također stvaraju oštećenja u perifernom živčanom sustavu usljed šećerne bolesti. Ranije spomenuti JNK i PKC, kao i MPAK (*engl. mitogen activated protein kinase*), transkripcijski faktori kao NF-κB, mogu se aktivirati usljed oksidativnog stresa, potičući stvaranje upalnih faktora, kao što su citokini, interleukini, tumor necrosis factor- α (TNFα). Izuzev oksidativnog stresa, AGE i aktivacija RAGE, također potiču stvaranje medijatora upale, poglavito aktivacijom transkripcijskog faktora NF-*κ*B koji potiče ekspresiju gena za sintezu upalnih faktora. Transkripcijski faktor NF-κB se povezuje i sa poticanjem apoptoze te suprimiranjem ekspresije gena za sintezu antioksidansa čime pojačava oksidativni stres (41). Upalna reakcija koja se stvara izaziva niz kaskadnih reakcija u kojima jača oksidativni stres i potiče se apopotoza, no utječe i na stvaranje demijelinizacijskih procesa (46).

Strukturne promjene neurona, kao što je glikacija mijelinskih proteina, potiču infiltraciju monocita, makrofaga i neutrofila i stvaranje novih medijatora upale, dovode do oštećenja mijelinske ovojnice, edema i promjene provodljivosti stanice (41).

Oštećenja krvnih žila koji opskrbljuju periferne živce također mogu uzrokovati DN-u kroz nekoliko različitih mehanizama. Jedna od prvih promjena koje su pronađene na *vasae nervorum* je zadebljanje bazalne membrane. Veća zadeljanja bazalne membrane su dovedena u vezu sa težinom oštećenja perifernih živaca (47, 48). Endotelne stanice kapilara su također oštećene, zbog čega dolazi do „curenja" u mikrocirkulaciji. Zajedničko ovim promjenama je da dovode do hipoksije perifernih živaca (30). Također, pronađeno je da dolazi do redukcije faktora koji utječu na formiranje i održavanje mikrocirkulacije kao što su VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*), angiopoietini, IGF (*engl. insulin like growth factor*), NGF (*engl. neural growth factor*) (47). Unatoč navedenim promjenama, promjena gustoća mikrocirkulacije nije imala jednake promjene kroz brojna istraživanja. Evidentirana je povećana, smanjena i nepromjenjena gustoća mikrocirkulacije perivernih živaca. Smatra se da bi objašnjenje moglo biti u kompenzatornim mehanizmima, koji na oštećenje cirkulacije i hipoksiju reagiraju poticanjem proliferacije (47).

Schwanove stanice (SS), izuzev uloge u provođenju impulsa, tvore fizičku barijeru prema izvanstaničnom okolišu i stvaraju okoliš bogat metabolitima za lakšu opskrbu aksona energijom (34, 49). SS oslobađaju laktate koje aksoni utiliziraju za stvaranje ATP-a (49). Imaju na površini GLUT-1 (*eng. glucose transporter 1*), protein koji pripada grupi membranskih proteina koji pomažu transport glukoze kroz membranu. Istažuje se njegova uloga kod šećerne bolesti i nastanka neuropatije, no pretpostavka je da bi moglo doći do rezistencije ili smanjeng izražaja na površini zbog čega bi zbog smanjenog unosa glukoze došlo do smanjene proizvodnje laktata, te bi akson mogao „gladovati" (34). Drugi mogući mehanizam nastanka oštećenja je putem lipidnog metabolizma koji je aktivan u SS-ma. Korak pri kojem bi moglo doći do oštećenja je gomilanje Acetil CoA, koji u održanim uvjetima ulaskom u Krebsov ciklus generira stvaranje NADPH i ATP-a. Kod povećanog unosa lipida, može doći do pojačanog unosa Acetil CoA koji se pretvara u acil-karnitin, koji bi se zbog gomilanja u SS-ma, mogao „potisnuti" u akson (34). Dokazano je da Acil-karniti djeluje toksično na DRG-je (50), no pokazuje jednako djelovanje i na aksone (50). Također, nakupljanje navedenih produkata bi moglo dovesti do nedostatnog stvaranja energije u stanici. Kod miševa koji su bili na dijeti bogatoj mastima, dokazano je oštećenje perifernih živaca oksidativim stresom, putem oksidiranog LDL-a, što bi kod DM2

zbog hiperlipidemije i metaboličkog sindroma mogao biti dodatni uzrok oštećenja perifernih živaca.

Smatra se da je na nastanak neuropatije kod šećerne bolesti važan i učinak inzulina, koji se se razlikuje ovisno o tome je li riječ o DM1 ili DM2. Kako inzulin ne djeluje izravno na unos glukoze u perifernim živcima, smatra se da je u procesu oštećenja perifernih živaca bitan njegov utjecaj na kaskadne reakcije putem inzulinskih receptora (34). Najvažniji mehanizam kojim inzulin djeluje je signaliziranje putem tirozin kinaze, koja vežući se za inzulinski receptor potiče fosforilaciju ciljnih proteina od kojih su najvažniji supstrati inzulinskog reeptora (*engl. insulin receptor substrates, IRS*), koji su ključan medijator u daljnjem prenošenju signala u stanici (51, 52). Mehanizmi kojima inzulin djeluje na stanične aktivnosti su kompleksni, smatra se da utječe na rast aksona putem faktora rasta (*engl. insulin like growth factor-I, IGF-I*), potiče rast neurita (53), održava adekvatan stanični rad i funkciju neuralnih mitohondrija (54) i prijenos signala u sinapsama (55). Stoga, mogući nastanak oštećenja kod DM1 bi mogao biti upravo u izostanku staničnog signaliziranja i poticaja sinteze proteina ključnih za rast i funkciju perifrnih živaca zbog nedostatka inzulina (56). Utvrđivanje povezanosti inzulina sa nastankom neuropatije kod DM2 je složenije zbog više čimbenika koji mogu utjecati na oštećenja zbog popratnog metaboličkog sindroma, no sve je više dokaza da i živčano tkivo razvija rezistenciju na inzulin mehanizmima istim kao jetra, mišićno i masno tkivo. Rezistencija na inzulin i kod živčanog tkiva se očituje povećanom aktivnošću JNK-e (*engl. c-Jun N-terminal Kinase*) i smanjenim izražajem inzulinskih receptora (57). Inzulin aktivira JNK-u, koji potom blokira signaliziranje inzulina, djelujući kao povratna sprega (58). Uloga JNK-e je višestruka i nedovoljno istražena, no blokiranje prijenosa signala inzulinskih receptora bi mogao biti put nastanka DN-e. Neovisno radi li se o nedostatku inzulina ili rezistenciji na inzulin, sve je više dokaza o važnosti njegove uloge u razvoju dijabetičke neuropatije (34, 59).

1.6.1.1. Morfološke i funkionalne karakterisktike dijabetičke neuropatije

Dijabetička neuropatija je karakterizirana aksonalnom degeneracijom, demijelinizacijom i atrofijom, uz što se nadovezuje nemogućnost aksonalne regeneracije, remijelinizacije i sinaptogeneze (60). Obilježja dijabetičke neuropatije su također bubrenje dendrita, neadekvatno grananje dendrita i opadanje broja izdanaka neurita (61). Dijabetička neuropatija se može javiti u obliku dijabetičke poliradikulopatije, dijabetičke mononeuropatija i autonomne neuropatije. Dijabetička poliradikulopatija je obično simetrična, u kliničkoj slici dominiraju motorički deficiti, dok je mononeuropatija rijeđa, a karakterizira je ispad jednog izoliranog živca. Kod

dijabetičkih polineuropatija su česte parestezije, gubitak osjeta, hiperestezije i grčevi (62). Autonomna neuropatija može zahvatiti kardiovaskularni, genitourinarni, probavni i metabolički sustav (63). Kada je zahvaćen kardiovaskularni sustav, dijabetička autonomna neuropatija se očituje poremećajem krvnog tlaka, kardiomiopatijom, fenomenom nijeme srčane ishemije (64), te poremećajima srčanog ritma i maligne aritmije (65, 66). Unatoč težini ovih komplikacija šećerne bolesti, još uvijek nisu posve razjašnjeni mehanizmi promjena u gustoći inervacije i vrsti živčanih vlakana u dijabetičnim srcima, što zahtjeva bolje razumijevanje anatomske raspodjele i funkcije srčanih vlakana.

1.7. Utjecaj šećerne bolesti na autonomnu inervaciju srca /SAN (Srčana autonomna neuropatija)

Najozbiljniji oblik dijabetičke neuropatije je srčana autonomna neuropatija, koja se manifestira promjenama srčanog ritma, ortostatskom hipotenzijom, smanjenom tolerancijom tjelesnog napora i vježbanja, tihom ishemijom miokarda zbog oštećenja autonomnih osjetnih vlakana, povećanom stopom iznenadne srčane smrti, kao i većim brojem komplikacija tijekom operativnih zahvata i sporijim oporavkom (67, 68). Pregledom dostupne literature našli smo velik broj studija koje istražuju posljedice hiperglikemije na srčanom tkivu, međutim ne postoje studije koje su sustavno pratile kvantitativne promjene unutarnje sastavnice autonomne i osjetne srčane inervacije u štakorskom modelu šećerne bolesti tipa I u razdoblju od drugog tjedna do godinu dana trajanja dijabetesa. Studije koje su do sada napravljene uglavnom su rađene na srcima pokusnih životinja, primjerice svinja (69, 70) štakora (71-74) i miševa (75), analizirajući pri tom promjenu u inervaciji srčanih zalistaka, poremećaje u prijenosu signalnih molekula ili analizirajući samo inervaciju srca bez utjecaja patoloških promjena (2, 5, 76). Istraživanja provedena u ljudi koji boluju od diabetesa mellitusa tip I većinom su proučavala promjenu srčane frekvencije i tlaka, kao posljedicu oštećenja autonomne srčane inervacije (77, 78), a također je uočeno da aksoni u tkivima uzetih iz atrija osoba koje boluju od dijabetesa kroz razdoblje od 8 i više godina imaju znatno više degenerativnih promjena u odnosu na aksone iz atrija odgovarajućih kontrolnih skupina (79).

1.7.1. Promjena simpatičke inervacije srca kod šećerne bolesti

Dijabetička autonomna neuropatija (DAN), kao najviše istraživana od svih dijabetičkih neuropatija, uzrok je promjenama srčanog ritma kod dijabetesa. Kod kraćeg trajanja bolesti dolazi do simpatičke hiperinervacije i parasimpatičke denervacije, u skladu s čim dolazi i do promjena srčanog ritma (80). Proučavajući promjene na elektrokardiografu (EKG) utvrđeno je

da kod pacijenata sa šećernom bolesti dolazi do tahikardije, skraćenja QRS i QT intervala, smanjenjem amplitude T vala i slabijom repolarizacijom. Navedene promjene nisu specifične samo za šećernu bolest, može ih se pronaći i kod drugih patoloških stanja ili utjecaja lijekova (triciklički antidepresivi), stoga se smatra da su ove promjene odraz pojačane aktivnosti simpatikusa kod šećerne bolesti (77). U kliničkoj se praksi srčana autonomna neuropatija najčešće dokazuje neinvazivnim parametrima kao što su Ewingov test, koji uključuje promjene srčanog ritma pri stajanju, dubokom disanju i Valsalvinovom manevru, zatim varijabilnošću srčanog ritma (nije specifičan znak; drugi čimbenici također utječu na promjene) i turbulencijom srčanog ritma. Turbulencija srčanog ritma je relativno nov parametar u određivanju srčane autonomne neuropatije, mjeri se elektrokardiografski, pokazuje osjetljivost baroreceptora kod pacijenata sa šećernom bolesti (78). Stevens je 1998. g., želeći utvrditi uzrok nastanka malignih aritmija kod pacijenata sa šećernom bolesti, izveo istraživanje sa radioaktivnim analozima norepinefrina. Utvrdio je da u proksimalnim dijelovima klijetki dolazi do pojave simpatičke hiperinervacije, dok u distalnim dijelovima dolazi do denervacije (67). Slične rezultate daje i studija u kojoj 3. mjeseca nakon indukcije dolazi do denervacije u distalnim dijelovima klijetki s poštedom u proksimalnim djelovima i hiperinervacijom, dok 6 mjeseci nakon indukcije dolazi do izražene denervacije u klijetkama i distalno i proksimalno. Također dolazi do parasimpatičke denervacije već u ranim stadijima bolesti, te se smatra da je prevaga simpatikusa, kao i inhomogena raspodjela inervacije uzrok aritmijama (81, 82). Istraživanje provedeno na ženkama Wistar štakora, kojima je injekcijom STC induciran dijabetes, radioimunoesej je pokazao povišenu koncentraciju norepinefrina (NE) u lijevoj i desnoj klijetci 1. mjesec nakon indukcije i 22. mjeseca nakon indukcije dijabetesa, no u razdoblju 2. i 4. mjeseca nakon indukcije bolesti nije bilo značajne razlike u koncentraciji NE (83). Slična studija, u kojoj je također mjerenje razine NE-a radioimunoesejem, pokazalo da u početnom stadiju DM-a dolazi do porasta NE-a u pretklijetkama štakora, uspoređuje i promjene razine NE-a u pretklijetkama kontrolnih skupina, gdje je utvrđeno smanjenje razine NE-a starenjem (84). Srca zečeva kojima je induciran dijabetes bilježe povećanu razinu NE-a i proliferaciju simpatičkih vlakana. Neke studije su, naprotiv, dobile oprečne rezultate, tako da su u početnim stadijima bolesti razine srčanog NE-a snižene (73, 85) ili nepromijenjene (74). Dosadašnje spoznaje o promjenama simpatičkih živčanih završetaka, unatoč tome što govore o simpatičkoj proliferaciji kod dijabetesa, ne govore o kvantitativnim promjenama živčanih završetaka kod dugotrajnog dijabetesa.

1.7.2. Promjena parasimpatičke inervacije srca kod šećerne bolesti

Distribucija i gustoća parasimpatičkih vlakana u srcima zdravih pokusnih životinja je donekle poznata, dok se o promjenama koje se događaju kod šećerne bolesti ne zna puno. U desnoj pretklijetci srca štakora kojima je STZ-om izazvan DM, dolazi do pada ChAT pozitivnih vlakana 10 tjedana od početka bolesti (80). U srcima STZ-om izazvanog DM-a kod miševa, 16 tjedana nakon indukcije bolesti nije bilo razlike u količini ChAT pozitivnih vlakana, izuzev što je zabilježen porast ChAT pozitivnih vlakana u SA čvoru dijabetičkih skupina u odnosu na kontrolne (86).

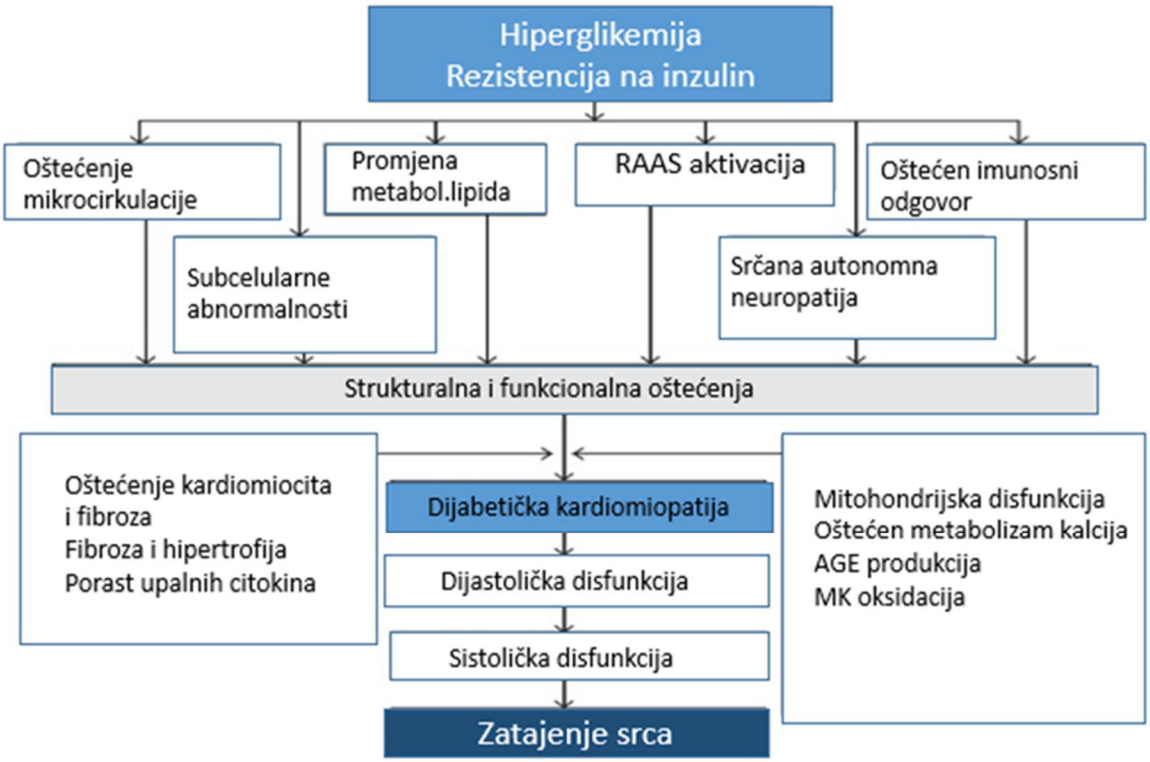
1.7.3. Promjena osjetne inervacije srca kod šećerne bolesti

Malo se zna o promjenama koje se događaju u aferentnim vlaknima srca pod utjecajem šećerne bolesti. Najvažniji aspekt tih promjena je pojava nijeme srčane ishemije kod bolesnika s dijabetesom. Za detekciju osjetnih vlakana korišteni su većinom peptidi vezani uz gen kalcitonina (engl. calcitonine gene related peptide- CGRP), neuropeptid Y (NPY) i supstancija P (SP). Studija koja je promatrala promjenu CGRP-a u dijabetičkim srcima kroz razdoblje od 4, 8 i 16 tjedna nakon injekcije STZ-a, pokazala je da koncentracija CGRP-a raste u pretklijetkama i klijetkama kroz 16 tjedana, dok se raspodjela CGRP pozitivnih vlakana nije značajno mijenjala. Dobiveni rezultati govore u prilog povećanoj akumulaciji u vlaknima što je mogući uzrok njihove promijenjene funkcije (87). Miševi kojima je induciran dijabetes nisu imali promjena u CGRP pozitivnim vlaknima 4. tjedan nakon indukcije, dok je 8. tjedan nakon indukcije broj pao za 53% u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija CGRP-a u srcima miševa nije se mijenjala nakon 8 tjedana, dok se smanjila za 60% nakon 16 tjedna u odnosu na kontrolnu skupinu (88). Istraživanje na humanim atrioventrikularnim valvulama uzetim pri obdukciji, nije pokazalo značajnu razliku u osjetnoj inervaciji između dijabetičkih i odgovarajućih kontrolnih skupina (89). Promjene Neuropeptida Y (NPY) kao biljega osjetne inervacije srca kod dijabetesa opisane su malobrojnim studijama. Iako se NPY može naći u neuronima simpatičkih ganglija, interneuronima, kao i cijelom središnjem i perifernom živčanom sustavu (90), koristi se i kao biljeg za osjetne neurone. Tako je uočeno da se broj NPY pozitivnih vlakana smanjuje u klijetkama, no ne i u pretklijetkama, kod dužeg trajanja dijabetesa (87). Značajna redukcija intenziteta bojanja CGRP i NPY pozitivnih vlakana je

uočena kod dugotrajnog dijabetesa (12 i 24 mjeseca) u trikuspidalnoj i mitralnoj valvuli (71). CGRP je značajno reduciran i u dermisu kože dijabetičkih pacijenata (91). Supstancija P (SP) kao imunohistokemijski biljeg osjetnih vlakana reducira se u miokardu i spinalnom gangliju (*engl. dorsal root ganglia – DRG*) dijabetičkih štakora, kao i CGRP (92), iako postoje nedosljednosti i u tim rezultatima, tako da Willars i suradnici nisu pronašli promjene u SP imunoreaktivnosti u atrijima dijabetičkih štakora, dok je također u DRG-ima došlo do redukcije imunopozitivnih SP vlakana kod dugotrajnog DM-a (93). Studija o kvantitativnim promjenama osjetnih vlakana, poglavito o NF200 pozitivnim vlaknima u ventrikulima tijekom dugotrajnog dijabetesa, nema.

1.8. Dijabetička kardiomiopatija

Dijabetička kardiomiopatija označava gubitak sistoličke i dijastoličke funkcije srca kojoj su kao uzroci isključene bolesti valvula, hipertenzija i bolesti krvnih žila srca (68). Pojam dijabetičke kardiomiopatije je prvo predložio Rubler 1970. godine. Na ljudskim srcima umrlih od zatajenja srca, koji su pritom imali dijabetes, isključio je druge uzroke smrti, kao što su bolesti koronarnih arterija, hipertenziju i promjene uzrokovane alkoholom (94). Remodeliranje srca kod dijabetesa i hipertrofija srca kao posljedica hiperglikemije nastaje zbog više različitih uzroka koji nisu još uvijek do kraja istraženi. Najčešće promjene koje se nalaze u dijabetičkim srcima su intersticijska i perivaskularna fibroza, metaboličke promjene, mikrovaskularne promjene, promjene u renin- angiotenzin- aldosteronskom sustavu (RAAS), neprikladan odgovor imunološkog sustava i promjene autonomne inervacije (95, 96). Smatra se da su odlaganje triglicerida (koje je često u šećernoj bolesti tipa 2) i povećan vanstanični volumen preduvjet za odlaganje kolagena i stvaranje intersticijske fibroze. Povećan se vanstanični volumen smatra izravnim lošim prognostičkim znakom za zatajenje srca u dijabetičkoj populaciji. Glikolizirane molekule koje se odlažu u miokard se prepoznaju kao inicijatori upalnih reakcija, nakon čega dolazi do apoptoze, fibroze i infiltracije upalnih stanica, čime miokard gubi mogućnost rastezanja, te dolazi do dijastoličke disfunkcije te uvećanja atrija (posljedica atrijska fibrilacija).



Slika 3. Shematski prikaz uzročno-posljedičnih čimbenika srčanog zatajenja uslijed dijabetesa; AGE - konačni produkti glikacije (engl. *advanced glycation end products*); MK - masne kiseline

Metaboličke promjene kod dijabetesa tipa 2 su karakterizirane i povećanom koncentracijom masnih kiselina u krvi i rezistencijom perifernih tkiva na inzulin zbog čega dolazi do nemogućnosti iskorištavanja glukoze te se povećava oksidacija masnih kiselina, što je specifično za dijabetičko srce. Oštećenje kardiomiocita kod dijabetesa se najvjerojatnije događa zbog nemogućnosti pohranjivanja veće količine lipida koji aktivacijom upalnih reakcija djeluju lipotoksično. Hiperglikemija u kardiomiocitima uzrokuje oksidativni stres koji smanjuje njihovu kontraktilnu sposobnost, ubrzava apoptozu i oštećuje DNK-u (96). Smatra se da kod srčanog zatajenja dolazi do povećane potražnje za glukozom, koja se ne može iskoristiti zbog rezistencije perifernih tkiva na inzulin (tip 2). Zbog toga nedostaje energije za rad što dodatno pogoršava srčano zatajenje. Smatra se da su ketonska tijela alternativni oblik energije u ovakvim situacijama, no još se ne zna djeluju li protektivno na srce ili dodatno ubrzavaju srčano zatajenje. Štetni učinci hiperinzulinemije na kardiomiocite kod DM tipa 2 također su opisani, jer uzrokuju hipertrofiju kardiomiocita, kao i fokalnu fibrozu miokarda (96). Mikrovaskularne promjene su najčešće uzrok nefropatije, retinopatije i neuropatije, no događaju se i u malim

krvnim žilama srca. Karakterizirane su stvaranjem mikroaneurizama, proliferacijom u endotelu i subendotelu sa stvaranjem fibroze u malim koronarnim arterijama, kao i perivaskularno te zadebljanjem bazilarne membrane u kapilarama, oštećenja vasa vasorum. Sve ove promjene uzrokuju mikroishemije miokarda sa stvaranjem fibroze (95). Promjene u autonomnoj inervaciji koje pridonose razvoju dijabetičke kardiomiopatije su povećana aktivnost simpatikusa, a smanjena parasimpatikusa, što uzrokuje promjene kontraktilnosti srčanog ritma, kao i perfuzije srčanog mišića krvlju. Aktivacija RAAS-a ima značajnu ulogu kod srčane disfunkcije u DM-u. Angiotenzin II potiče rast stanica, čime potiče proliferaciju srčanih fibroblasta i proliferaciju kardiomiocita, dok bi aldosteron mogao djelovati ublažavajuće na učinke angiotenzina (95). Iako je složen mehanizam nastanka dijabetičke kardiomiopatije, dobra regulacija GUK-a uz promjenu životnih navika bi mogla spriječiti ovu pogubnu komplikaciju šećerne bolesti.

1.9. Dijabetička autonomna neuropatija u drugim organskim sustavima

1.9.1 Probavni sustav

Promjena autonomne inervacije kod šećerne bolesti može se odraziti na bilo koji dio probavnog sustava. Može se očitovati ezofagealnom enteropatijom, gastroparezom, konstipacijom, proljevima, fekalnom inkontinencijom. Čak 50% ljudi koji boluju od šećerne bolesti često imaju simptome kao što su mučnina, povraćanje, abdominalna bol, proljev i nadutost. Parasimpatička inervacija gastrointestinalnog trakta ide preko n. vagusa, izuzev posljednje trećine debelog crijeva. Parasimpatikus ubrzava motilitet probavnog sustava, dok mu simpatikus djeluje antagonistički (97). Kako su se slične tegobe javljale kod osoba sa vagotomijom koja se ranije koristila pri liječenju ulkusne bolesti, pretpostavilo se da se radi o autonomnoj dijabetičkoj neuropatiji. Studije na miševima i štakorima su i potvrdile takve pretpostavke, tako da su dokazane neurodegenerativne promjene i gubitak neurona u mijenteričnom pleksusu kod DM-a (98, 99). Druge studije smatraju da je slaba veza između neurodegenerativnih promjena i oslabljenog motiliteta probavnog sustava (100), te da bi trebali uzeti u obzir i upalne, kao i vaskularne promjene koje se događaju pod utjecajem šećerne bolesti (99). Za dijagnozu motiliteta probavnog sustava kod dijabetičke autonomne neuropatije se u kliničkoj praksi većinom koriste scintigrafske metode (97).

1.9.2. Neuropatija uslijed poremećaja inervacije žlijezda znojnica

Neuropatija malih distalnih autonimnih vlakana je jedan od prvih znakova dijabetičke neuropatije. Osobe sa šećernom bolesti često imaju promjene znojenja, suhu kožu, sklonu ulceracijama. Ove promjene nastaju zbog oštećenja sudomotora, postganglijskih simpatičkih kolinergičkih nemijeliziranih vlakana koja inerviraju žlijezde znojnice. Koristi se nekoliko neurofizioloških testova za evaluaciju funkcije sudomotora, testiranje termoregulacije znojenja (*engl. Thermoregulatory Sweat Testing, TST*), kvantitativno testiranje refleksa aksona sudomotora (*engl. quantitative sudomotor axon reflex testing, QSART*), simpatički odgovor kože (*engl. sympathetic skin response, SSR*), kvantitativni direktni i indirektni test refleksa aksona (*engl. quantitative direct and indirect axon reflex testing, QDIRT*) (101, 102).

1.9.3. Mokraćni mjehur

Procjenjuje se da više od polovine osoba sa sa šećernom bolesti tipa 1 i četvrtina osoba sa šećernom bolesti tipa 2 ima disfunkciju mokraćnog mjehura izazvanu oštećenjem autonomne inervacije usljed šećerne bolesti. Tegobe koje se pritom najčešće javljaju su dizurija, učestalo mokrenje, nikturija, osjećaj nepotpunog pražnjenja. Izuzev oštećenja autonomne inervacije mokraćnog mjehura, smatra se da dolazi i do oštećenja glatkih mišića mjehura. Duljim trajanjem bolesti, povećava se incidencija inkontinencije. Korelacija disfunkcije mokraćnog mjehura s drugim dijabetičkim neuropatijama je 75-100% (102, 103).

1.10. Eksperimentalni model šećerne bolesti

Pokusni životinjski modeli indukcije šećerne bolesti danas su prihvaćen model za istraživanje patofiziologije šećerne bolesti. Kako bi se bolje razumjela patogeneza šećerne bolesti, koristi se više različitih pokusnih modela, koji pružaju mogućnost proučavanja funkcionalnih kao i genetskih osobitosti. Kada je riječ o šećernoj bolesti tipa I, moguće je više metoda nastanka bolesti kao što je kemijski izazvana, operativno i spontano nastala bolest. Spontano nastala šećerna bolest kod eksperimentalnih životinja osobito je pogodna za proučavanje autoimunih reakcija. Razvija se kod nekoliko vrsta laboratorijskih životinja, kao što su NOD miševi (*engl. non obiese diabetic mouse*), dijabetesu skloni Bio Breeding štakori, LETL štakori (*engl. Long-Evans Tokushima Lean*), KDP štakori *(engl. Komeda diabetes prone*) i LEW- iddm štakori (*engl. Lewis-insulin dependent diabetes mellitus*) (104). NOD miševi i BB štakori su dvije najčešće korištene vrste. Za kemijsku indukciju šećerne bolesti koriste se streptozotocin (STZ)

i aloksan, jer su toksični za β stanice gušterače, te uzrokuju šećernu bolest tipa 1. Putem glukoznog transportera 2 (GLUT 2) STZ se unosi u β stanice gušterače, gdje potom uzrokuje fragmentaciju DNK (105). STZ primjenjen u dozi od 60 mg/ kg nakon 2- 4 dana izaziva šećernu bolest. Može se primijeniti intravenski, intraperitonealno i subkutano (106). Šećerna bolest tipa 1 se još može izazvati pomoću virusa i operativnim uklanjanjem gušterače (107, 108). Za proučavanje dijabetičke neuropatije STZ je godinama bio model izbora (109). Rakieten je 1963. godine uvidio dijabetogeno djelovanje STZ-a na štakorima i psima (110). Izuzev hiperglikemije, kod životinja se javljaju i poliurija i polidipsija, kao i gubitak na težini. Tehnički nedostatci su velika smrtnost pokusnih životinja. Zamjerka ovom modelu dijabetsa je i hepatotoksično djelovanje STZ-a. Bilo je upitno ima li STZ i neurotoksično djelovanje, no prema istraživanjima STZ nije uzrok slabije provodljivosti perifernih živaca (111). Iako i danas, nekoliko desetljeća nakon prve upotrebe STZ-a, postoje dvojbe i razlike u protokolima i dozi koja se aplicira, zbog toga što je u pitanju tehnički lako izvediv, ekonomski prihvatljiv model i primjenjiv na više životinjskih vrsta, i dalje je jedan od često korištenih modela šećerne bolesti (112). Ovom modelu se zamjeralo i što zbog načina indukcije nije analogan dijabetesu kod ljudi (104), no pitanje koji od navedenih modela najbolje reflektira promjene kod ljudi i dalje ostaje otvoreno. Iako je mnogu pokusnih modela šećerne bolesti, nijedan u potpunosti ne oponaša patofiziologiju te bolesti u ljudi, no svaki od njih može doprinijeti boljem razumjevanju bolesti i terapijskim mogućnostima.

1.11. Imunohistokemijski biljezi

Imunohistokemijskim metodama uz pomoć specifičnih neuronalnih biljega moguće je u srcu razlikovati pojedine vrste neurona i njihovih vlakana. Koristili smo PGP9.5, Neurofilament 200 (NF200) i tirozin hidroksilazu (TH).

1.11.1. PGP9.5

Kao panneuronalni biljeg kojeg sadrže svi neuroni najčešće se koristi PGP9.5 (eng. protein gene product 9.5). PGP9.5 je citoplazmatska ubikvitarna C-terminalna hidroksilaza specifična za neurone i neuroendokrine stanice perifernog i središnjeg živčanog sustava u sisavaca (113). Specifičnost izražaja PGP9.5 u neuronima dovela je do korištenja ove bjelančevine kao biljega inervacije u brojnim imunohistokemijskim studijama (114). Bjelančevina se također koristi kao biljeg u analizi neuroendokrinih tumora (115) i neuronalnih staničnih linija (113). Iako su

regulacija i funkcija PGP9.5 kroz životni tijek neurona slabo istraženi, visoka razina izražaja upućuje na njegovu važnu ulogu u fiziologiji neurona (113). Potpora toj tvrdnji su studije koje govore o nakupljanju ubikvitina i PGP9.5 u inkluzijskim tjelešcima unutar oštećenja povezanih s nekoliko neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (116). Do sada postoji nekoliko studija koje su istraživale ovu bjelančevinu u srčanim neuronima i njihovim vlaknima, dok ne postoje istraživanja koja su kvantificirala izražaj PGP9.5 u srcima dijabetičnih štakora u razdoblju od drugog tjedna do godinu dana trajanja dijabetesa. Studija u kojoj je na kultiviranim stanicama intrizičkih srčanih neurona štakora, streptozotocinom induciran dijabetes, potom uzeta tkiva srca 3. i 6. mjeseci nakon indukcije, pokazuje da njihovi neuriti imaju znatno veći postotak bubrenja, te više distrofičnih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu nakon 3 mjeseca, dok su distrofične promjene bile izraženije nakon 6 mjeseci, sa izraženijim grananjem neurita, no znatno manjim brojem novih izdanaka (117).

1.11.2. Tirozin hidroksilaza

Tirozin hidroksilaza (TH) je enzim koji sudjeluje u stvaranju endogenih katekolamina, katalizirajući hidroksilaciju tirozina u L-DOPA (118), koji je važni prekursor adrenergičkih neurotransmitera središnjeg i perifernog živčanog sustava, stoga se koristi kao biljeg specifičan za noradrenergičke neurone i njihova vlakna. Adrenergički neuroni koji inerviraju srce također sadrže tirozin hidroksilazu, kako bi sintetizirali noradrenalin, signalnu molekulu za podražljivost kardiomiocita (72). TH je identificirana u epikardijalnim ganglijima srca čovjeka, zamorca i štakora (119), te je pokazala aktivnost u živčanim završetcima svih dijelova srca, no nešto manju u desnoj klijetki u odnosu na lijevu (116, 119).

1.11.3. Neurofilament 200

Neurofilament 200 (NF200) koristi se kao biljeg za osjetne neurone i pripada obitelji intermedijarnih filamenata nađenih u aksonima zrelih neurona (120). Velike je molekularne mase (200 kD). U srcu NF200 je najvećim dijelom pronađen u neuronima i vlaknima epikarda klijetki (71, 73). Biljeg je mijeliniziranih neurona (121). Oštećenje neurona uslijed dijabetesa dovodi do gubitka boli i osjeta (122).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi

Štakor kao pokusna životinja, kao i štakorski model dijabetesa induciran streptozotocinom (STZ), su se pokazali kao adekvatan model za proučavanje promjena izazvanih hiperglikemijom. Iako postoje istraživanja koja na štakorskom modelu dijabetesa proučavaju inervaciju srca, ne postoji studija koja proučava kvantitativne promjene pojedinih vrsta vlakana, kao i njihovu distribuciju u klijetkama, tijekom dugodjelujuće šećerne bolesti. Predložena disertacija se, stoga, bavi istraživanjem promjena živčanih završetaka u klijetkama kroz trajanje šećerne bolesti u vremenu od 12 mjeseci, koristeći pri tom specifične biljege kako bi diferencirali pojedina vlakna.

Ciljevi predloženog istraživanja su:

-Utvrditi promjenu ukupne površine živčanih završetaka u klijetkama koristeći panneuralni biljeg PGP9.5 tijekom 12 mjeseci šećerne bolesti.

-Utvrditi promjenu površine specifičnih živčanih završetaka u klijetkama koje se događaju pod utjecajem dugodjelujućeg dijabetesa, koristeći biljege tirozin hidroksilazu (TH) za simpatička vlakna i Neurofilament 200 kD (NF200) za osjetna vlakna.

-Za navedene vrste vlakana utvrditi postoji i promjena u njihovoj distribuciji u pojedinim regijama lijeve i desne klijetke.

-Utvrditi kvantitativne promjene pojedinih vrsta vlakana koje se odvijaju kroz vrijeme pod utjecajem dijabetesa.

-Usporediti skupine kontrolnih (zdravih) životinja, te vidjeti imunohistokemijske karakteristike pojedinih vrsta vlakana, njihovu distribuciju i kvantitativne promjene koje se događaju starenjem.

-Istražiti postoje li u srcima životinja kojima je induciran dijabetes znakovi razvoja dijabetičke kardiomiopatije, kao posljedice dugodjelujućeg dijabetesa.

-Utvrditi koji su dijelovi klijetki najizloženiji promjenama inervacije usljed šećerne bolesti, kako bi se daljnjim istraživanjima pronašao način za prevenciju oštećenja, te kako se

mijena inervacija srca kroz vrijeme trajanja bolesti kako bi se pronašlo vrijeme u kojem je najvažnije terapijski djelovati.

2.5. Hipoteze

1. Živčana vlakna će pod utjecajem šećerne bolesti promijeniti ukupnu površinu i distribuciju u klijetkama, neovisno o vrsti vlakana

2. Promjene će biti izraženije trajanjem šećerne bolesti

3. Starenjem će se smanjit broj ukupne površine vlakana, neovisno o vrsti vlakna

4. Dužim trajanjem bolesti znakovi razvoja dijabetičke kardiomiopatije će biti izraženiji

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etičko odobrenje

Etičko Povjerenje Medicinskog fakulteta u Splitu je odobrilo ovu studiju, a svi pokusi unutar istraživanja provedeni su u skladu sa smjernicama za rukovanje laboratorijskim životinjama (European Communities Council Directive 24.11.1986.) Poduzete su sve mjere kako bi se minimalizirao broj životinja i njihova patnja tijekom eksperimenta.

3.2. Pokusne životinje

Studija je provedena na štakorima soja Sprague-Dawley koji su pribavljeni iz Nastambe za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu. Štakori su bili svi mužjaci, mase 160 do 210 g. Držani su pod temperaturom 22±1°C uz pola dana svijetla, pola dana mraka. Bili su smješteni u plastičnim kavezima uz slobodan pristup hrani i vodi.

3.3. Indukcija i utvrđivanje šećerne bolesti

Štakori su se na početku pokusa dva tjedna hranili odgovarajućom hranom, nakon čega su primili odgovarajuću injekciju. Štakorski model diabetesa tip I je induciran nakon cjelonoćnog posta, intraperitonealnom injekcijom streptozotocina (STZ) razrijeđenog u citratnom puferu (pH 4,5) i apliciranog u dozi od 55 mg/kg. Kontrolnim životinjama je injiciran čisti citratni pufer. Hranjeni su ad libitum standardnom laboratorijskom hranom za štakore koja sadrži 27% proteina, 64% ugljikohidrata i 9% masnoća (4RF21 GLP, Mucedola, Settimo Milanese, Italy).

Razine glukoze u krvi su mjerene iz krvi uzete iz repne vene (One Touch Vita instrument, LifeScan, High Wycombe, UK) kako bi se utvrdila indukcija dijabetesa. Životinje koje su uključene u daljnju studiju su imale razinu glukoze u krvi >16,5 mmol/L četvrti dan nakon indukcije DM. Tjelesna težina i razina glukoze u krvi su mjerene tjedno.

Pokusne životinje su podijeljene u skupine, svakoj dijabetičkoj skupini je dodijeljena odgovarajuća kontrolna skupina, ovisno o periodu nakon indukcije dijabetesa (2 tjedna, 2 mjeseca, 6 mjeseci, 12 mjeseci). Svaka skupina, dijabetička i kontrolna se sastojala od 6 životinja.

3.4. Prikupljanje i priprema tkiva

Životinje su prvo anestezirane odgovarajućim anestetikom (isoflurane; Forane, Abbott Laboratories, Queenborough, UK) potom perfundirane kroz uzlaznu aortu s fiziološkom otopinom, a potom s Zambonijevim fiksativom (4% paraformaldehid i 15% zasićena pikrinska kiselina u 0,1M fosfatnom puferu, pH7,4) Po završetku perfuzije, pristupilo se vađenju srca koja su naknadno fiksirana Zambonijevim fiksativom. Poprečnim rezom kroz ventrikule su uzeta tkiva ventrikula koja su uklopljena u parafin. Parafinski blokovi su rezani na 7µm tanke rezove, pomoću mikrotoma (LEICA RM 2155, Leica Microsystem Nussloch GmbH, Nussloch, Njemačka), uz stalno hlađenje korištenjem ledenih blokova. Ravnanje rezova provedeno je uz pomoć vodene kupelji zagrijane na 45°C, nakon čega su rezovi montirani na silanizirana predmetna stakalca (Histobond +, Paul MarienfeldGmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Njemačka). Rezovi su potom deparafinizirani, rehidrirani u etanolu i vodi, isprani u destiliranoj vodi, zatim grijani 12 minuta na temperaturi od 95°C u citratnom puferu (pH 6,0).

3.5. Imunohistokemijsko bojenje i mikroskopska obrada

Nakon pripreme, rezovi su inkubirani primarnim protutijelima. Primarna protutijela (Tablica 1) su PGP9.5 (1:100, ab8189, Abcam, Cambridge, MA, USA), tirozin hidroksilaza (1:500; ab113, Abcam, Cambridge, UK) i Neurofilament 200 kDa (1:200, Ab8135, Abcam, Cambridge, UK), koji su prethodno razrijeđeni, potom aplicirani. Rezovi sa razrijeđenim primarnim protutijelima su ostavljena preko noći u vlažnoj komori. Odgovarajuća sekundarna protutijela (Tablica 2) su se primijenila nakon ispiranja rezova u 0,01M PBS-u (3x10 minuta). Rezovi su inkubirani sa sekundarnim protutijelom kroz 1 sat i potom ponovno ispirana u 0,01 M PBS (3x10 min). Nakon ispiranja rezovi su prekriveni pokrovnim stakalcem nakon stavljanja medija za uklapanje (Immu-mount medium,Thermo scientific,Pittsburgh, SAD).

Naziv	Vrsta	Proizvođač	kat.broj	Razrjeđenje
PGP9.5	Miš	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab8189	1:100
TH	Ovca	Abcam, Cambridge, UK	ab113	1:500
NF200	Kunić	Abcam, Cambridge, UK	Ab8135	1:200

Tablica1. Primarna protutijela

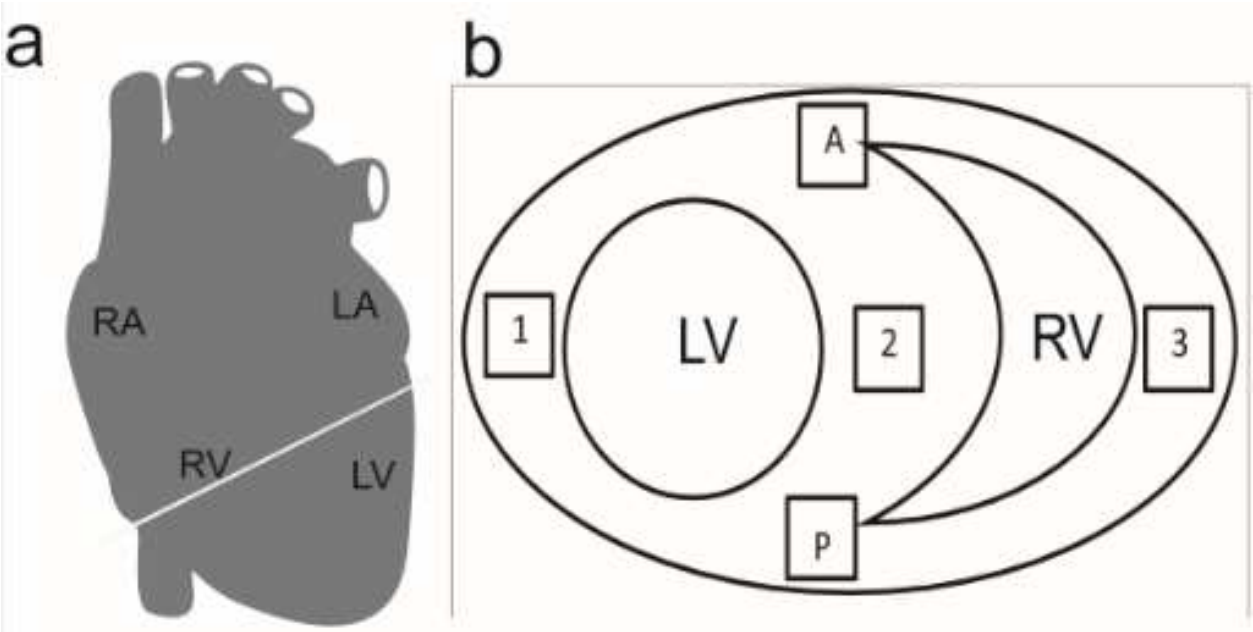
Naziv	vrsta	Proizvođač	kat. Broj	Razrjeđenje
mišji IgG Texas red	Kozji	Life 124 Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA	T862	1:200
zečiji IgG Rhodamine red	Magarac	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA	711-295-152	1:300
kozji IgG Rhodamine red	Magarac	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA	705-295-003	1:300

Tablica 2. Sekundarna protutijela

3.6. Analiza slika i kvantifikacija

Histološki presjeci kroz klijetke su se snimali mikroskopom BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) opremljenim računalnim programom za slikovnu dijagnostiku (Cell A, Imaging Software for Life Sciences Microscopy,Olympus, Tokyo, Japan), pod povećanjem x40. Slike smo analizirali unutar područja: lijeva klijetka, desna klijetka, interventrikularni septum, prednja i stražnja stijenka klijetke uz interventrikularni septum računalnim programom Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, SAD) i ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Unutar odabranih područja mjerili smo broj i udio površine (engl. threshold area %) koju

pokrivaju pozitivna živčana vlakna, te usporedili s istim područjima u odgovarajućoj kontrolnoj skupini. Usporedili smo ukupnu površinu vlakana određene skupine sa odgovarajućom kontrolnom skupinom, kao i pojedine regije klijetke za svaki odabrani vremenski period sa odgovarajućom kontrolnom skupinom. Promatrane su i promjene pojedinih vlakana kroz sazrijevanje za sve dobne skupine kao i pojedine regije klijetki dijabetičkih i kontrolnih životinja.

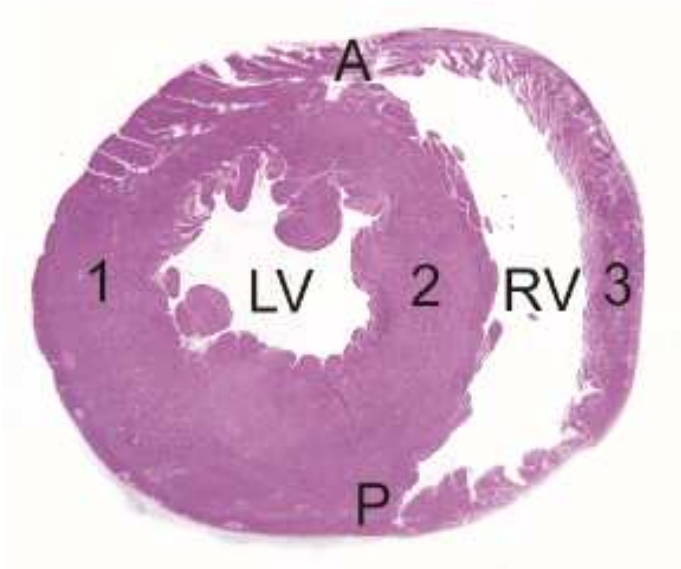


Slika 4. Razina presjeka kroz klijetke (a), 1 mm ispod aurikula je učinjen gornji rez kroz klijetke te je uzeto tkivo debljine 5 mm za analizu. LA lijeva pretklijetka (*engl. left atrium*); RA desna pretklijetka (*engl. right atrium*); LV lijeva klijetka (*engl. left ventricle*); RV desna klijetka (*engl. right ventricle*), područja klijetki koja su uzeta za analizu (b), 5 polja u pojedinim regijama ventrikula koja smo analizirali, u svakom od njih je slikano 6 slika, 1 - lijeva stijenka lijeve klijetke, 2 - interventrikularni septum, 3 - stijenka desne klijetke, A - prednja stijenka lijeve klijetke, P - stražnja stijenka lijeve klijetke.

3.7. Priprema rezova za utvrđivanje kardiomiopatije

Naposljetku, nakon deparafinizacije, rez srca svake pokusne životinje je obojan hemalaunu u trajanju 3- 5 minuta, ispiran jednu minutu u destiliranoj, potom 5- 10 minuta u vodovodnoj vodi. Potom je slijedilo bojanje eozinom 3- 5 minuta i ponovno dehidriranje (provođenje rezova kroz alkohole koncentracija od 70 %-tnog do 100%-og alkohola). Navedeno bojanje je

izvedeno u svrhu pripreme preparata na kojima se mjerila veličina kardiomiocita i debljina stijenke lijeve klijetke, radi utvrđivanja postojanja kardiomiopatije.



Slika 5. Prikaz H&E obojanog preparata, (LV - lijeva klijetka, RV - desna klijetka, 1 - lijeva stijenka lijeve klijetke, 2 - interventrikularni septum, 3 - stijenka desne klijetke, A - prednja stijenka lijeve klijetke, P - stražnja stijenka lijeve klijetke)

3.8. Statistička analiza

3.8.1 Izračun veličine uzorka

Za potrebe ove studije proveden je izračun veličine uzorka u programu G*Power 3.1.2 (Franz Faul, Universitaet Kiel, Njemačka). Kao temelj za izračun odabrana je površina klijetki prekrivena živčanim vlaknima pozitivnim na korištena protutijela u odnosu na ukupnu površinu klijetki u područjima od interesa. Medijan pokusne skupine je bio 0.014, a u kontrolnoj skupini 0.031. Mjera varijabilnosti je bila 0.8. S obzirom na rezultate pilot studije procjena veličine uzorka pokazala je minimalan broj od 6 štakora po skupini da bi studija imala snagu istraživanja od 80% (1-β) uz razinu značajnosti od α =5%. U studiju su uzete životinje koje su zadovoljile kriterije uključenja ovisno o vrijednostima GUK-a, a njihov konačan broj u skupinama je zadovoljio veličinu uzorka.

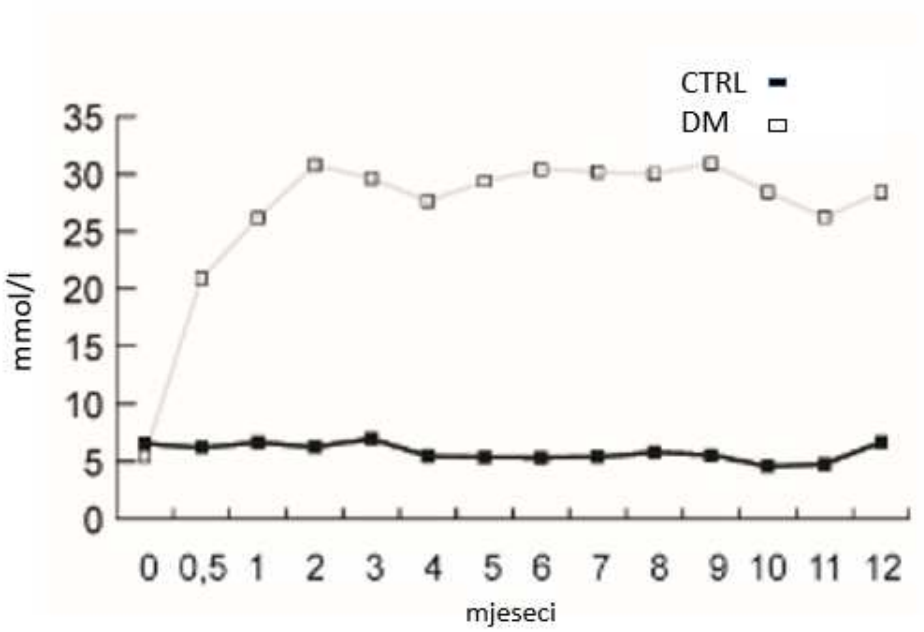
3.8.2 Statistički postupci

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (AS±SD). Mann-Whitney test je korišten za usporedbu između dvije grupe, dok su usporedbe između više grupa obrađene Kruskal-Wallisovom testom, potom Dunn post-hoc testom (GraphPad 146 Software, La Jolla, CA, USA). Rezultati su interpretirani na razini značajnosti $p<0.05$.

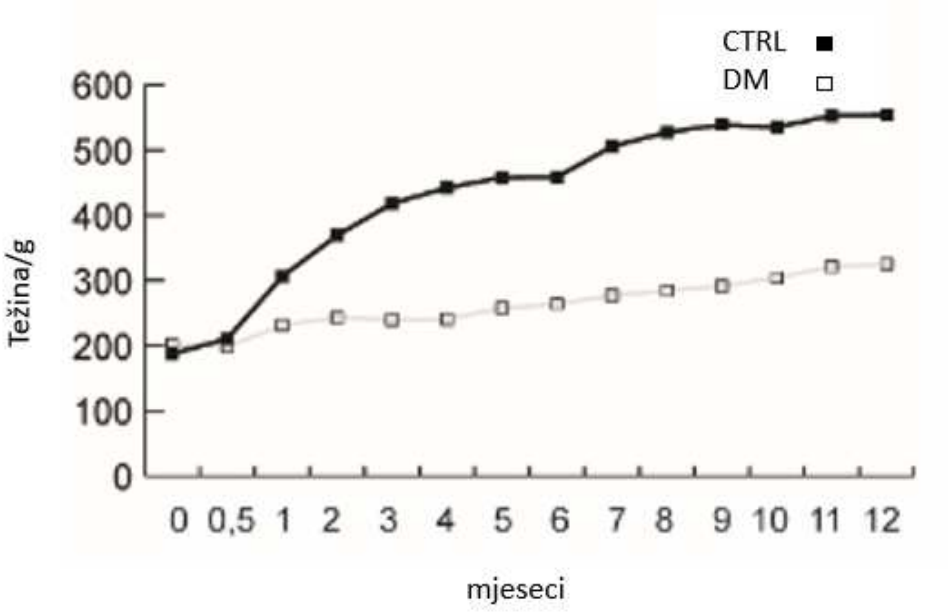
4. REZULTATI

4.1. Utvrđivanje dijabetesa

Štakori su bili 8 tjedana stari kada im je induciran DM. Hiperglikemija je utvrđena tjedan dana nakon aplikacije streptozotocina, te su vrijednosti šećera u krvi bile su značajno veće u odnosu na kontrolnu skupinu, kod dijabetičkih životinja iznosile su u prosjeku 28,6 mmol/L tijekom cijelog eksperimenta. Sve životinje uključene u studiju su u početku imale jednaku težinu, 160-180 g, no u skupini sa DM štakori su sporije dobivali na težini, te su krajem pokusa u prosjeku težile 243 g, u odnosu na kontrolnu skupinu koja je težila prosječno 348 g.



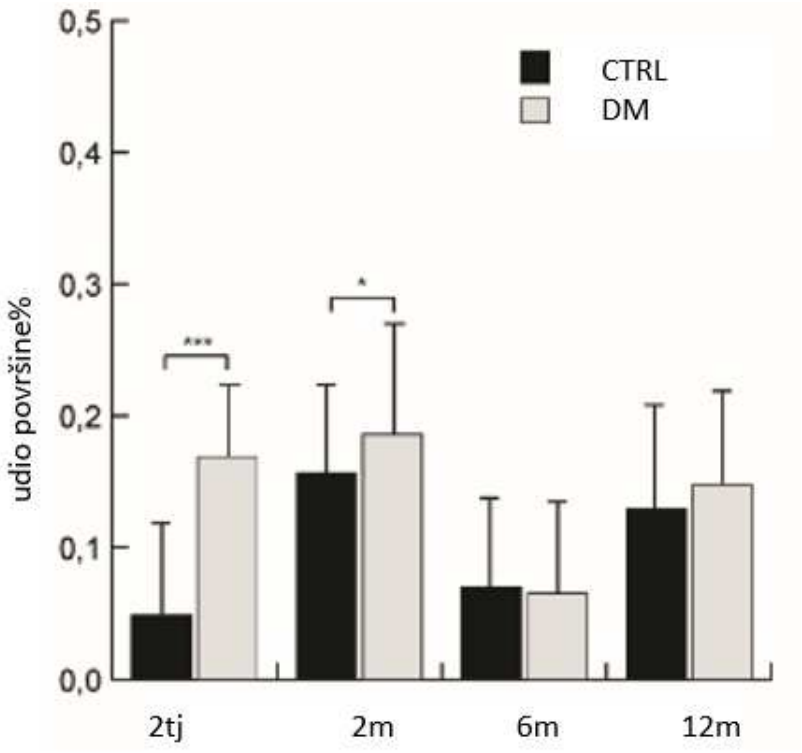
Slika 6. Grafički prikaz glukoze u krvi (GUK) kod kontrolnih i dijabetičkih životinja tijekom trajanja pokusa



Slika 7. Grafički prikaz tjelesne težine (TT) kod kontrolnih i dijabetičkih životinja tijekom trajanja pokusa

4.2. Usporedba PGP9.5 pozitivnih vlakana u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini kroz zadana vremenska razdoblja

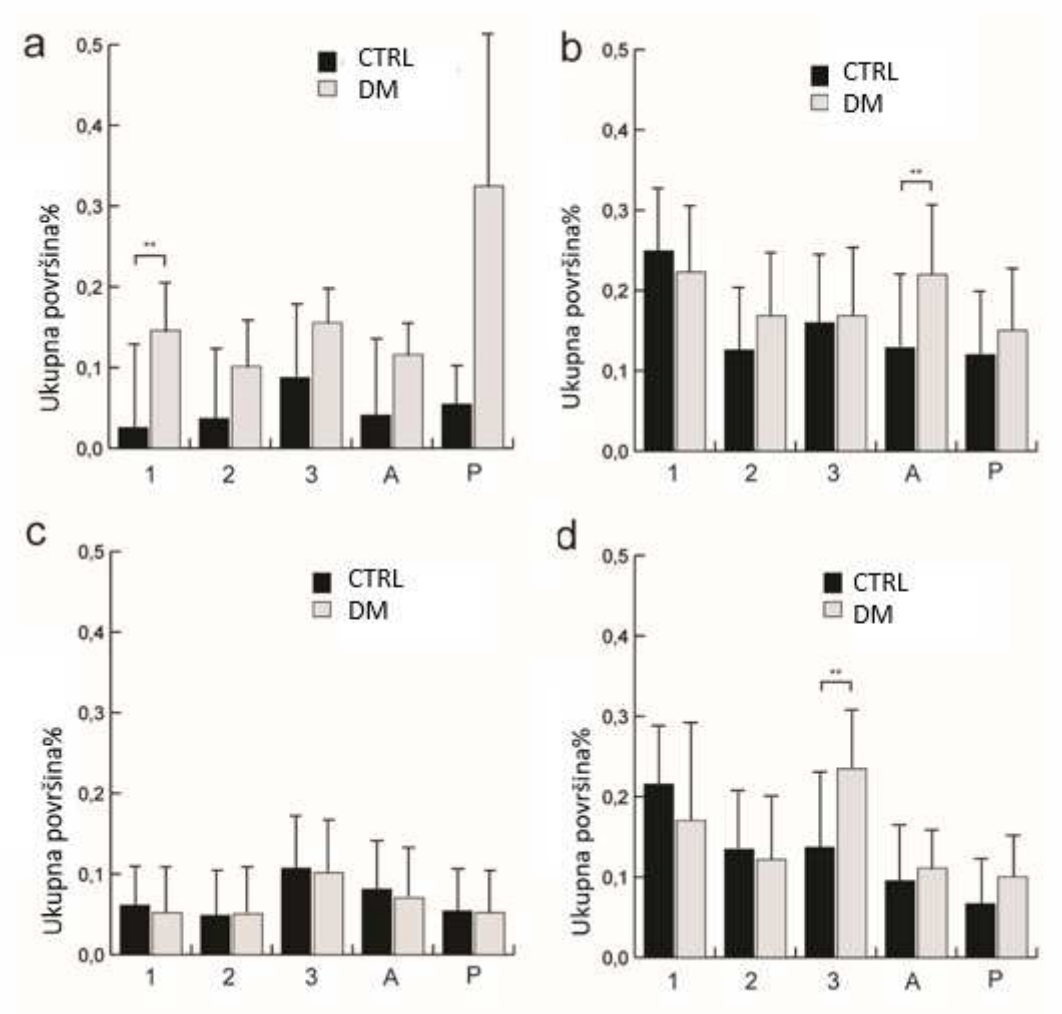
Neuralni biljeg PGP9.5 je upotrijebljen za detekciju svih aksona u srcu, neovisno o tipu vlakna. PGP9.5 pozitivna vlakna su detektirana kroz cijeli presjek klijetke, najčešće uz krvne žile. Uspoređujući sve promatrane regije klijetke zajedno, značajan porast uočen je kod dijabetičkih skupina nakon 2. tjedna ($p< 0.01$) i 2. mjeseca ($p<0.05$) od indukcije DM-a. Značajna razlika između DM i CTRL skupine nije pronađena nakon 6. i 12. mjeseca od indukcije DM-a (Slika 7).



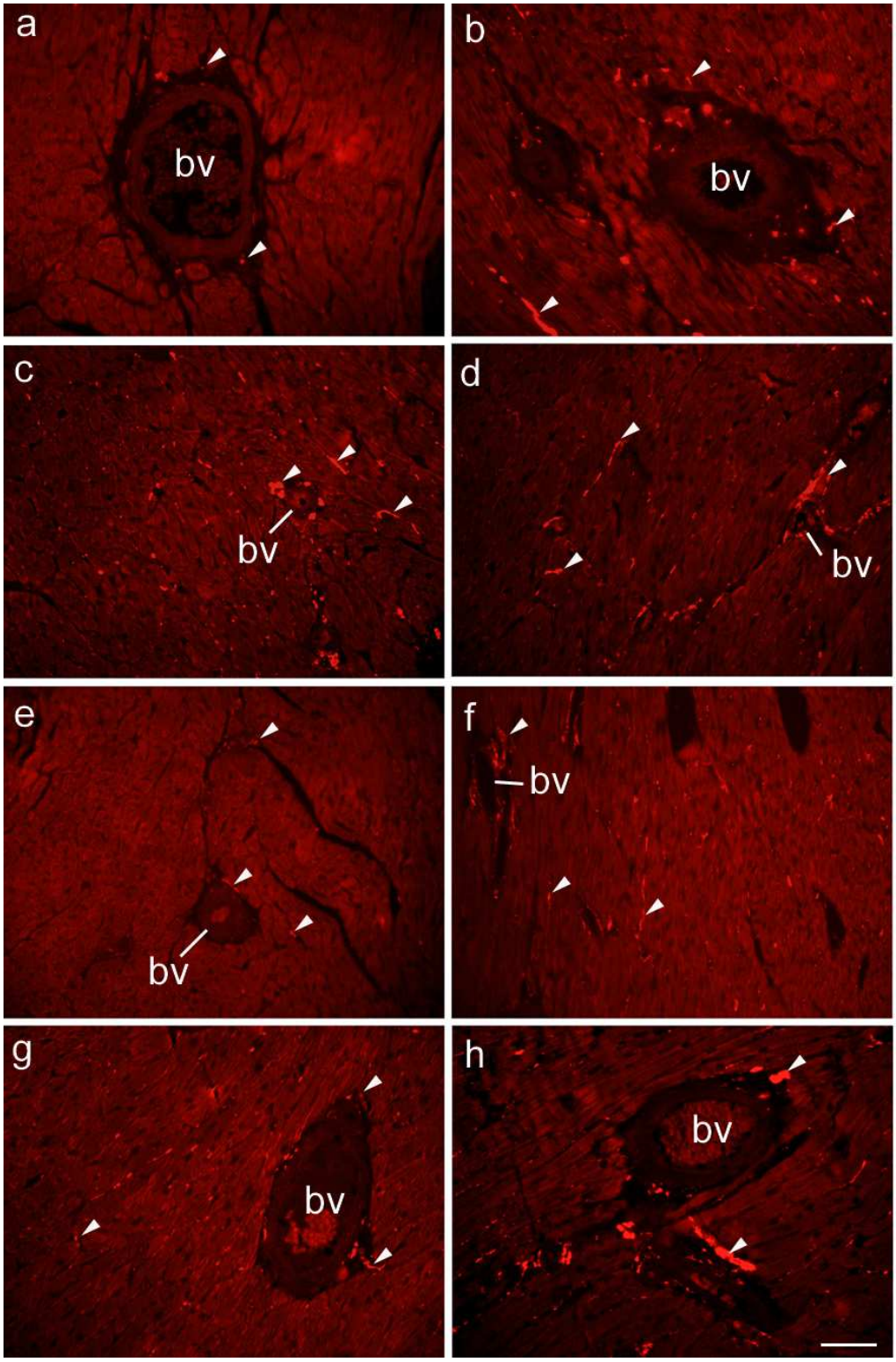
Slika 7. Prikaz odnosa ukupne površine PGP9.5 pozitivnih vlakana između dijabetičkih (DM) i kontrolnih skupina (CTRL), za razdoblja nakon 2. tjedna (2tj), 2. mjeseca (2m), 6. mjeseca (6m) i 12. mjeseca (12m), statistički značajna razlika *p≤0.05, ***p≤0.001.

4.3. Usporedbe PGP9.5 pozitivnih vlakana u različitim regijama klijetki dijabetičkih i kontrolnih skupina

U razdoblju od 2. tjedna nakon indukcije dijabetesa jedini značajan porast površine PGP9.5 vlakana zabilježen je u lijevoj klijetki (p=0.009) (Slika 8.a), dok u ostalim regijama nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. U vremenskom razdoblju od 2. mjeseca u prednjoj stijenki klijetke dijabetičke skupine je zabilježen porast u odnosu na kontrolnu skupinu (p=0.010) (Slika 8.b). Nakon 6. mjeseca nije bilo statistički značajne razlike u regijama između dijabetičkih i kontrolnih skupina (Slika 8.c), dok je nakon 12. mjeseca evidentiran porast jedino u desnoj klijetki dijabetičke u odnosu na kontrolnu skupinu (p=0.008) (Slika 8.d).



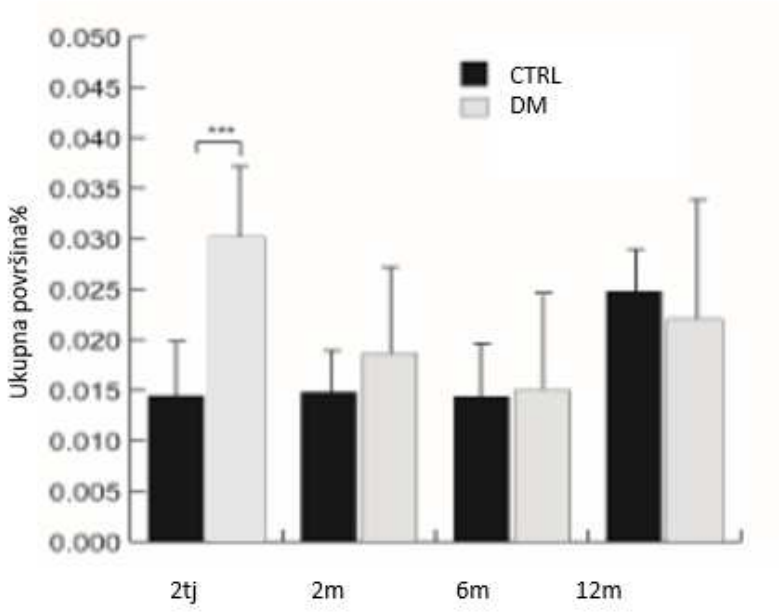
Slika 8. Usporedba ukupne površine PGP 9.5 pozitivnih vlakana između dijabetičkih (DM) i kontrolnih skupina (CTRL) kroz pojedine regije srca 1 - lijeva stijenka lijeve klijetke, 2 interventrikularni septum, 3 - desna klijetka, A - prednja stijenka lijeve klijetke, P - stražnja stijenka lijeve klijetke, za razdoblja od 2. tjedna (a), 2. mjeseca (b), 6. mjeseci (c) i 12. mjeseci (d). Statistički značajna razlika *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



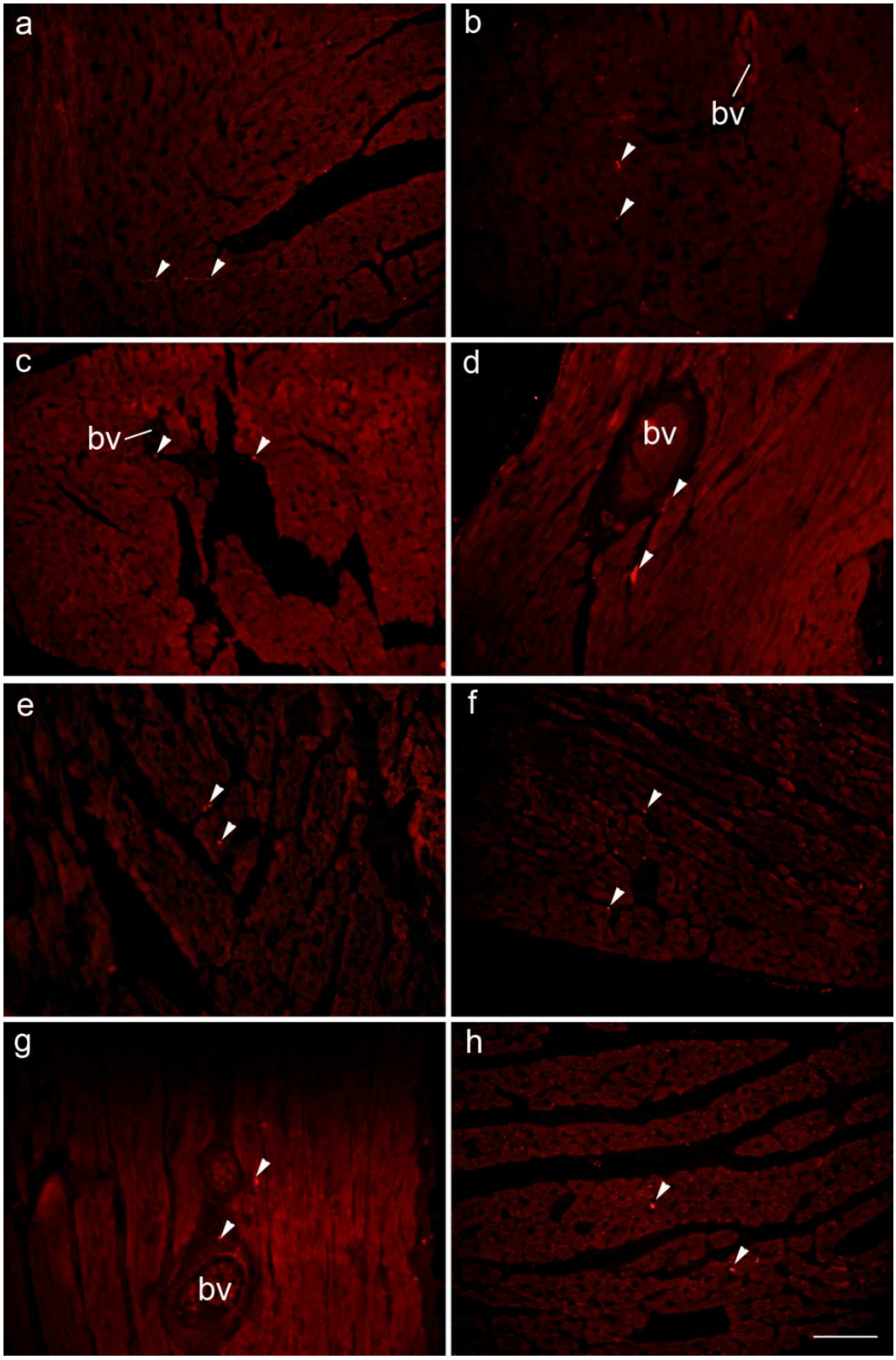
Slika 9. PGP 9.5 pozitivna vlakna su obojana intenzivno crveno, lokalizirana su većinom oko krvnih žila (bv, *engl. blood vessel*). Živčana vlakna u srcima kontrolnih životinja (a) i dijabetičkih životinja (b) nakon 2 tjedna; kontrolnih životinja (c) i dijabetičkih životinja (d) nakon 2 mjeseca; kontrolnih životinja (e) i dijabetičkih (f) nakon 6 mjeseci,; kontrolnih životinja (g) i dijabetičkih životinja (g) nakon 12 mjeseci. Mjerna ljestvica 100µ.

4.4. Usporedba NF200 pozitivnih vlakana u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini

Imunoreaktivnost za neuralni biljeg NF200 je bila u značajnom porastu u DM skupini 2. tjedan nakon indukcije (Slika 10.). Kroz ostala promatrana vremenska razdoblja nije bilo značajne razlike između dijabetičke i kontrolne skupine za NF200.



Slika 10. Prikaz odnosa ukupne površine NF 200 pozitivnih vlakana između dijabetičkih (DM) i kontrolnih skupina (CTRL), za razdoblja nakon 2. tjedna (2tj), 2. mjeseca (2m), 6. mjeseci (6m) i 12. mjeseci (12m), statistički značajna razlika ***$p \leq 0.001$.



Slika 11. NF200 pozitivna vlakna su obojana intenzivno crveno, lokalizirana su većinom oko krvnih žila (bv, *engl. blood vessel*). Živčana vlakna u srcima kontrolnih životinja (a) i dijabetičkih životinja (b) nakon 2 tjedna; kontrolnih životinja (c) i dijabetičkih životinja (d) nakon 2 mjeseca; kontrolnih životinja (e) i dijabetičkih (f) nakon 6 mjeseci,; kontrolnih životinja (g) i dijabetičkih životinja (g) nakon 12 mjeseci. Mjerna ljestvica 100µ.

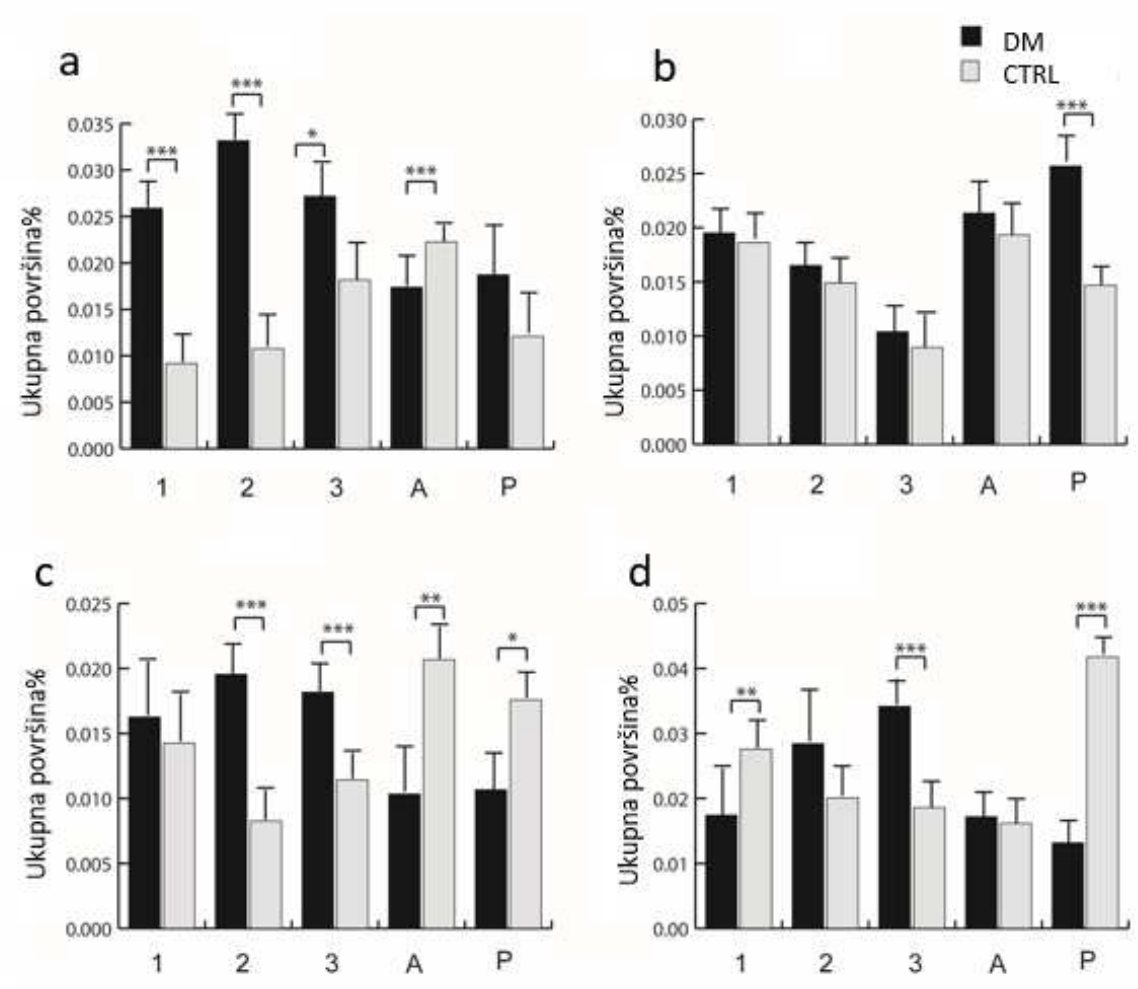
4.5. Usporedbe NF200 pozitivnih vlakana u različitim regijama klijetki dijabetičkih i kontrolnih skupina

NF 200 pozitivna vlakna u razdoblju od 2. tjedna nakon indukcije su značajno povišena u desnoj klijetki dijabetičkih srca u odnosu na kontrole ($p<0.05$). Interventrikularni septum i lijeva stijenka lijeve klijetke također pokazuju statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolne skupine ($p<0.001$). Nasuprot tome, prednja stijenka lijeve klijetke bilježi značajno manju površinu NF200 pozitivnih vlakana u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0.001$), dok stražnja stijenka lijeve klijetke ne pokazuje razliku u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12.a).

Jedina regija koja bilježi statistički značajan porast NF200 pozitivnih vlakana u odnosu na kontrolnu skupinu za razdoblje od 2. mjeseca nakon indukcije je stražnja stijenka lijeve klijetke (Slika 12.b, $p<0.01$).

Uspoređujući inervaciju svih regija 6. mjeseca nakon indukcije DM-a nije bilo značajne razlike između dijabetičkih i kontrolnih skupina, no uspoređujući pojedine regije klijetke (Slika 12.c), pronađeno je povećanje gustoće NF 200 pozitivnih vlakana u interventrikularnom septumu i desnoj klijetki ($p<0.001$), dok je u prednjoj stijenki lijeve klijetke ($p<0.01$) i stražnjoj stijenki lijeve klijetke ($p<0.05$) došlo do smanjenja u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedina regija u kojoj nije bilo razlike između dijabetičke i kontrolne skupine 6. mjeseca nakon indukcije DM-a je lijeva stijenka lijeve klijetke.

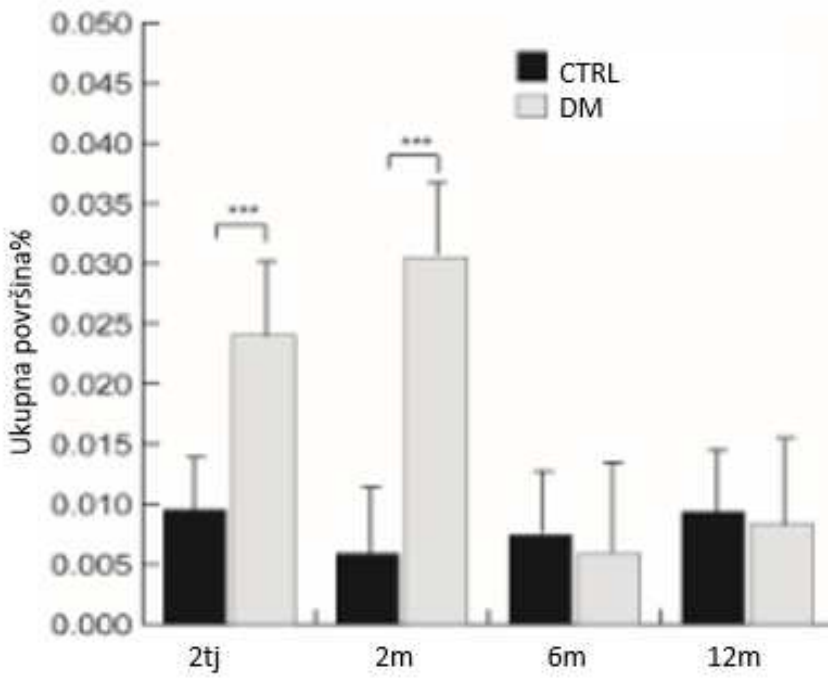
Unatoč tome što 12 mjeseci nakon indukcije (Slika 12.d) nije bilo značajne razlike u površini NF200 pozitivnih vlakana između dijabetičkih i kontrolnih skupina, promatrajući pojedine regije, porast je zabilježen u desnoj klijetki u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0.001$), a pad u stražnjoj ($p<0.001$) i lijevoj stijenki lijeve klijetke ($p<0.01$).



Slika 12. Usporedba ukupne površine NF200 pozitivnih vlakana između dijabetičkih (DM) i kontrolnih skupina (CTRL) kroz pojedine regije srca 1 - lijeva stijenka lijeve klijetke, 2 - interventrikularni septum, 3 - desna klijetka, A - prednja stijenka lijeve klijetke, P - stražnja stijenka lijeve klijetke, za razdoblja nakon 2. tjedna (a), 2. mjeseca (b), 6. mjeseca (c) i 12. mjeseca (d). Statistički značajna razlika *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.6. Usporedba TH pozitivnih vlakana u dijabetičkoj i kontrolnoj skupini

TH pozitivna vlakna su također bila rasprostranjena kroz klijetke, no najčešće su se ipak nalazila uz krvne žile, kao i drugi tipovi vlakana. Značajne razlike su pronađene 2. tjedna i 2. mjeseca nakon indukcije, gdje je značajno veći broj vlakana bio u dijabetičkoj skupini, dok nakon 6. i 12. mjeseca nije bilo razlike (Slika 13).



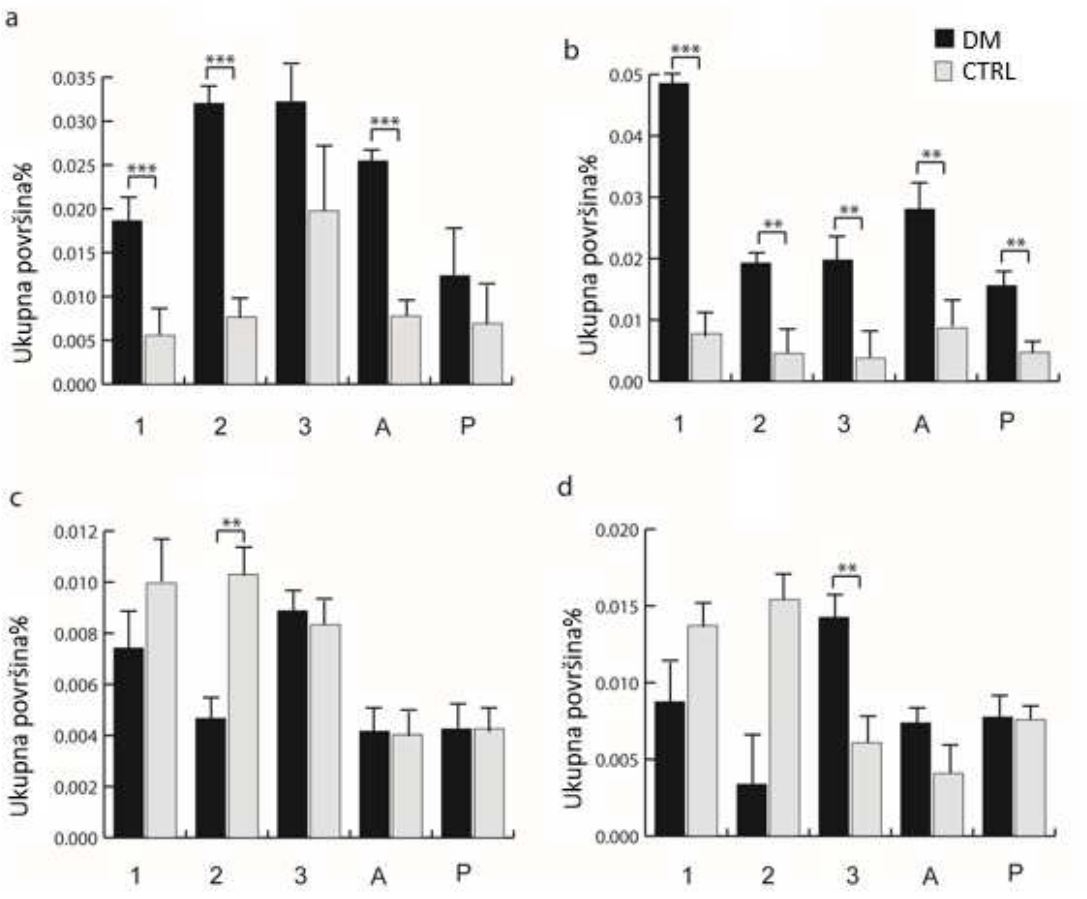
Slika 13. Prikaz odnosa ukupne površine TH pozitivnih vlakana između dijabetičkih (DM) i kontrolnih skupina (CTRL), za razdoblja nakon 2. tjedna (2tj), 2. mjeseca (2m), 6. mjeseca (6m) i 12. mjeseca (12m), statistički značajna razlika ***$p \leq 0.001$

4.7. Usporedbe TH pozitivnih vlakana u različitim regijama klijetki dijabetičkih i kontrolnih skupina

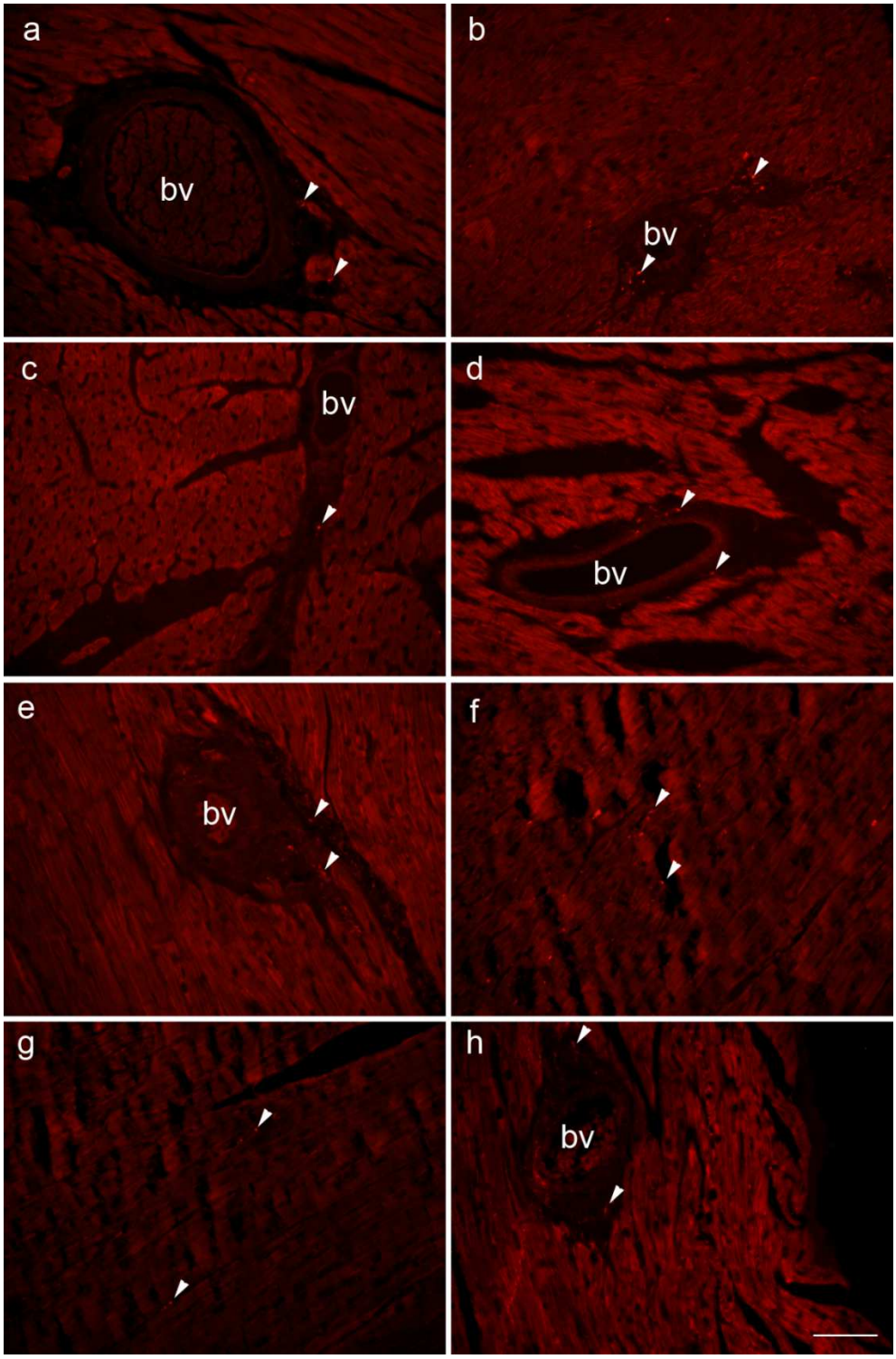
Povećanje gustoće TH pozitivnih vlakana 2. tjedna nakon indukcije je evidentirano u inetrventrikularnom septumu, lijevoj i prednjoj stijenki lijeve klijetke ($p<0.001$), dijabetičkih srca, dok u stražnjoj stijenci i desnoj klijetki nije bilo značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14.a).

Skupina dijabetičkih srca u dobi od 2. mjeseca nakon indukcije (Slika 14.b.) bilježi povećanje u svim regijama klijetke u odnosu na kontrolne skupine ($p<0.01$), dok je najveće povećanje pronađeno u lijevoj stijenci lijeve klijetke ($p<0.001$).

Iako u skupinama od 6. mjeseca i 12. mjeseca (Slika 14.c i d) nije bilo značajne razlike kada se promatraju sve regije skupa, uspoređujući regije pojedinačno, interventrikularni septum je imao značajno manju gustoću TH vlakana u usporedbi sa kontrolnom skupinom nakon 6. mjeseca ($p<0.01$), a desna klijetka je imala porast gustoće TH vlakana u usporedbi s kontrolom nakon 12. mjeseca.



Slika 14. Usporedba ukupne površine TH pozitivnih vlakana između dijabetičkih (DM) i kontrolnih skupina (CTRL) kroz pojedine regije srca 1 - lijeva stijenka lijeve klijetke, 2 - interventrikularni septum, 3 - desna klijetka, A - prednja stijenka lijeve klijetke, P - stražnja stijenka lijeve klijetke, za razdoblja od 2. tjedna (a), 2. mjeseca (b), 6. mjeseca (c) i 12. mjeseca (d). Statistički značajna razlika *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



Slika 15. TH pozitivna vlakna su obojana intenzivno crveno, lokalizirana su većinom oko krvnih žila (bv, engl. blood vessel). Živčana vlakna u srcima kontrolnih životinja (a) i dijabetičkih životinja (b) nakon 2 tjedna; kontrolnih životinja (c) i dijabetičkih životinja (d) nakon 2 mjeseca; kontrolnih životinja (e) i dijabetičkih (f) nakon 6 mjeseci,; kontrolnih životinja (g) i dijabetičkih životinja (g) nakon 12 mjeseci. Mjerna ljestvica 100µ

4.8. Promjene PGP9.5, NF200 i TH pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja kod dijabetesa

PGP9.5 pozitivna vlakna pokazala su statistički značajne razlike za sva zadana vremenska razdoblja ($p<0.001$). Površna vlakana je bila u porastu nakon 2. tjedna i 2. mjeseca. Nakon 6. mjeseca došlo je pada, no nakon 12. mjeseca ponovno je došlo do porasta (slika 7).

NF 200 pozitivna vlakna su bila u porastu 2 tjedna nakon indukcije DM-a ($p<0.001$) u usporedbi sa razdobljima od 2., 6. i 12. mjeseca od indukcije DM-a (Slika 9).

TH pozitivna vlakna bilježila su porast u nakon 2. tjedna ($p<0.001$), dosežući najveću vrijednost nakon 2. mjeseca ($p<0.001$), nakon čega je uslijedilo značajno smanjenje nakon 6. i 12. mjeseca ($p>0.05$, Slika 13).

4.9. Promjene PGP9.5, NF200 i TH pozitivnih vlakana tijekom starenja kod kontrolnih skupina

Kod kontrolnih skupina uzorak promjena kod starenja za PGP5.9 je bio sličan onome kod dijabetičkih skupina, te je pokazao značajnu razliku za sva zadana razdoblja ($p<0.001$). Površina vlakana je bila u porastu u razdobljima nakon 2. tjedna i 2. mjeseca, da bi uslijedio pad nakon 6. mjeseci, te ponovno rast nakon 12. mjeseci od indukcije bolesti (Slika 7).

Kontrolne skupine NF 200 su u periodu od 12. mjeseca nakon indukcije bolesti imale statistički značajan porast površine NF 200 pozitivnih vlakana ($p<0.005$, Slika 9), dok u drugim zadanim razdobljima nije bilo razlike.

TH pozitivna vlakna u kontrolnim skupinama nisu pokazala statistički značajnu razliku u zadanim vremenskim razdobljima ($p>0.05$, Slika 13).

4.10. Promjena PGP9.5 pozitivnih vlakana tijekom starenja u kontrolnim skupinama

Značajan porast PGP9.5 pozitivnih vlakana u vremenu nakon 2. tjedna pronađen je u lijevoj stijenci lijeve klijetke u usporedbi sa desnom klijetkom ($p<0.001$), dok u ostalim skupinama nije bilo značajne razlike ($p>0.05$ za sve skupine). Nakon 2. mjeseca lijeva stijenka lijeve klijetke ima značajno veću površinu pozitivnih PGP9.5 vlakana u usporedbi sa inetrventrikularnim septumom ($p<0.010$), prednjom stijenkom ($p<0.010$) i stražnjom stijenkom

lijeve klijetke ($p<0.010$). Značajno manje vrijednosti PGP9.5 su pronađene u interventrikularnom septumu u usporedbi sa desnom klijetkom ($p<0.05$) 6 mjeseci nakon indukcije DM-a, dok usporedbom drugih regija nije bilo značajne razlike. Pronađena je također značajna razlika između svih promatranih regija klijetke 12 mjeseci nakon indukcije DM-a ($p<0.05$ za sve) (Slika 7).

4.11. Promjena PGP9.5 pozitivnih vlakana tijekom starenja u dijabetičkim skupinama

Nije pronađena statistički značajna razlika u površini PGP9.5 pozitivnih vlakana između pojedinih regija u klijetkama dijabetičkih srca za vremenske periode nakon 2. tjedna, 2. mjeseca i 6. mjeseca ($p>0.05$ za sve), dok je nakon 12. mjeseca značajan porast pronađen u desnoj klijetki u usporedbi sa interventrikularnim septumom ($p<0.001$), prednjom ($p<0.001$) i stražnjom stijenkom ($p<0.001$) lijeve klijetke (Slika 7).

4.12. Promjena TH pozitivnih vlakana tijekom starenja u kontrolnim skupinama

Desna klijetka pokazuje značajno veću površinu TH pozitivnih vlakana u odnosu na lijevu stijenku lijeve klijetke nakon 2. tjedna ($p>0.05$). Nakon 2. i 6. mjeseca nema značajne razlike među pojedinim regijama ventrikula kontrolnih skupina, dok se nakon 12. mjeseca od indukcije DM, dakle u starosti štakora od 14 mjeseci, značajno povećanje nalazi u lijevoj stijenci lijeve klijetke u odnosu na prednju stijenku lijeve klijetke ($p>0.01$) i desnu klijetku ($p>0.01$, Slika 13).

4.13. Promjena TH pozitivnih vlakana tijekom starenja u dijabetičkim skupinama

Nakon 2. tjedna od indukcije DM nema značajne razlike TH pozitivnih vlakana između pojedinih regija klijetke. Kroz razdoblje od 2. mjeseca nakon indukcije DM lijeva stijenka lijeve klijetke ima značajno veću površinu TH pozitivnih vlakana u odnosu na sve ostale regije ($p>0.01$, $p>0.001$). Nakon 6. mjeseca od indukcije nema značajnih razlika među pojedinim regijama klijetke, dok je nakon 12. mjeseca značajno više TH pozitivnih vlakana u desnoj klijetki u odnosu na interventrikularni septum i stražnju stijenku lijeve klijetke ($p>0.05$, Slika 13).

4.14. Promjena NF200 pozitivnih vlakana tijekom starenja u kontrolnim skupinama

Povećan površina NF200 pozitivnih vlakana nakon 2. tjedna je uočen u desnoj klijetki ($p>0.001$, $p>0.01$) i prednjoj stijeki lijeve klijetke ($p>0.001$) u odnosu na ostale regije. Nakon 2. mjeseca desna klijetka ima značajno manju površinu vlakana u odnosu na lijevu stijenku ($p>0.001$), prednju stijenku ($p>0.001$), i interventrikularni septum ($p>0.05$). Nakon 6. mjeseca

interventrikularni septum ima znatno manje vlakana od lijeve (p>0.01),, prednje (p>0.001), i stražnje (p>0.01), stijenke lijeve klijetke, dok desna klijetka ima manje vlakana od prednje stijenke lijeve klijetke (p>0.05),. Nema značajne razlike između pojedinih regija nakon 12. mjeseca (Slika 11).

4.15. Promjena NF200 pozitivnih vlakana tijekom sazrijevanja u dijabetičkim skupinama

Nakon 2. tjedna lijeva stijenka lijeve klijetke ima značajno veću površinu NF200 pozitivnih vlakana u odnosu na stražnju stijenku lijeve klijetke (p>0.001), dok inetrventrikularni septum i desna klijetka imaju veću površinu od prednje i stražnje stijenke lijeve klijetke (p>0.001, p>0.05). Nakon 2. mjeseca dolazi do obrata te cijela lijeva klijetka imaja veću površinu NF200 vlakana u odnosu na desnu klijetku (p>0.001), prednja i stražnja stijenka i na inetrventrikularni septum (p>0.05). Nakon 6. mjeseca lijeva stijenka lijeve klijetke (p>0.05) i desna klijetka (p>0.001) imaju veću površinu pozitivnih vlakana u odnosu na prednju i stražnju stijenku. Nakon 12. mjeseca desna klijetka ima značajno veću površinu u odnosu na sve ostale regije (p>0.001), a interventrikularni septum naspram stražnje stijenke (p>0.01, Slika 11).

4.16. Validacija kardiomiopatije

Za utvrđivanje kardiomiopatije mjeren je promjer lijeve klijetke i veličina kardiomiocita. Iako za oba navedena parametra nije bilo statistički značajne razlike u usporedbi kontrolnih sa dijabetičkim skupinama za zadana vremenska razdoblja, uspoređujući ukupne vrijednosti za dijabetičke i kontrolne skupine, pronađena je statistički značajna razlika i u promjeru klijetke (Tablica 3.) i u veličini kardiomocita (Tablica 4.)

Tablica 3. Promjer LV (μm) po skupinama

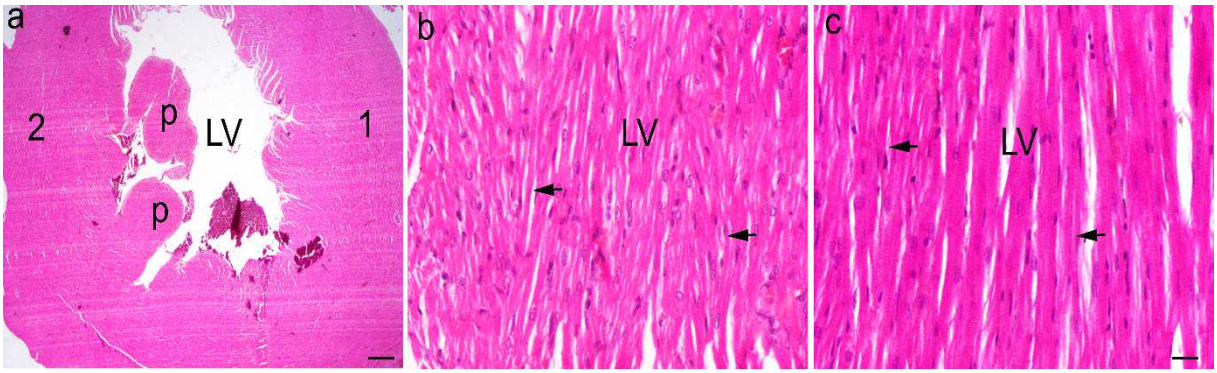
	Ctrl	Dm
2 tjedna	4,32	4,87
2 mjeseca	6,37	5,95
6 mjeseci	4,51	5,48
12 mjeseci	4,95	5,51
LV diametar (μm) ukupno	4.93	5.51*

*p<0.05, Mann-Whitney test.

Tablica 4. Veličina kardiomiocita (µm) po skupinama

	Ctrl	Dm
2 tjedna	0,0150	0,0170
2 mjeseca	0,0133	0,0112
6 mjeseci	0,0138	0,01317
12 mjeseci	0,0128	0,01329
cardiomyocytes diameter (µm)	0,0141±0.003	0.0134±0.002*

*p<0.05, Mann-Whitney test.



Slika 16. Transverzalni presjek kroz lijevu klijetku (a), normalna veličina mišićnih vlakana u lijevoj klijetci (označeno strelicama) (b) i povećana vlakna u lijevoj klijetci (označeno strelicama) (c); LV - lijeva klijetka, p papilarni mišići, 2 - interventrikularni septum, 1 - prednja stijenka lijeve klijetke; H&E, mjerna ljestvica 100 µm (a) and 25 µm (b - c).

5. RASPRAVA

U našem radu proučavane su promjene u inervaciji srca na štakorskom modelu dijabetesa tip I, kao i odgovarajućih kontrolnih skupina kroz odabrana vremenska razdoblja tijekom 12 mjeseci kako bismo utvrdili promjene u simpatičkoj, osjetnoj, te ukupnoj inervaciji srca. Za detekciju živčanih vlakana koristili smo imunohistokemijske biljege, za simpatička vlakana korištena je tirozin hidroksilaza (TH), za osjetna neurofilament 200 (NF200), a kao panneuronalni biljeg korišten je protein genski produkt 9.5 (PGP9.5). Prema našim saznanjima, ovo je prvi put da je inervacija srca mapirana imunohistokemijskim biljezima PGP9.5 i NF200 kroz presjeke klijetki dijabetičkih štakora u razdoblju od 12 mjeseci. TH je korišten ranije za utvrđivanje promjene simpatičkih vlakana u srcima dijabetičkih štakora, no ne u istim vremenskim intervalima, kao ni u istim regijama srca. Upotrebom PGP9.5, ubikvitarnog neuralnog biljega, uočili smo bifazčan uzorak inervacije za dijabetičku skupinu kao i kontrolnu. Značajno povećanje ukupne površine živčanih završetaka u ventrikulima dijabetičkih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu pojavljuje se već 2 tjedna nakon indukcije. Porast se nastavlja i nakon 2 mjeseca. Razdoblje od 6 mjeseci nakon indukcije bilježi smanjenje ukupne površine vlakana u obje skupine, da bi nakon 12 mjeseci od indukcije dijabetesa ponovno došlo do porasta u obje skupine. Navedene promjene bi mogle biti kompenzatorni mehanizam na oštećenja vlakana, jer bi u prvom valu porasta ukupne površine živčanih završetaka štetnu noksu mogla predstavljati hiperglikemija i popratni mehanizmi oštećenja kod DM-a, dok bi smanjenje ukupne površine vlakana moglo značiti iscrpljenje kompenzatornih mehanizama. Ponovan porast, obzirom da se pojavljuje i u dijabetičkih i kontrolnih štakora, može značiti i utjecaj drugih čimbenika, kao što je starenje. Stoga smo pokušali diferencirati vlakna, te odrediti na koji način se odvijaju navedene promjene kod simpatičke i osjetne inervacije srca.

Srce je obilno opskrbljeno autonomnim živčanim vlaknima, koji vrlo precizno kontroliraju srčanu funkciju, stoga svaka štetna noksa može mijenjajući inervaciju, znatno utjecati na preciznu kontrolu srca. Autonomna dijabetička neuropatija u ljudi se prezentira heterogenim uzorkom, gdje je simpatička denervacija izraženija distalno u odnosu na proksimalne dijelove klijetke. Kod štakorskog modela dijabetesa induciranog STZ-om, slične promjene su uočene za neuralni čimbenik rasta (engl. neural growth factor, NGF), koji se smanjuje prema distalnim dijelovima, što ide u prilog adekvatnosti štakorskog modela za promjene koje se događaju u ljudi kod šećerne bolesti.

Ukupna inervacija klijetki obilježena panneuronalnim biljegom PGP9.5 nije pokazala dosljedan uzorak promjena u pojedinim regijama klijetki pod utjecajem šećerne bolesti, no promatrajući

ukupnu površinu kroz zadana vremenska razdoblja, utvrđeno je da dolazi do porasta živčanih završetaka nakon 2 tjedna i 2 mjeseca od indukcije bolesti. Nakon 6 mjeseci dolazi do denervacije, odnosno pada površine živčanih terminala. Slične promjene uočio je i Schmid sa suradnicima, na studiji sa štakorima kojima je STZ-om induciran dijabetes, potom scintigrafski praćena promjena u simpatičkoj inervaciji pomoću C-11 hidroksiepinefrina koje su potom uspoređene sa promjenama NGF-a i koncentraciji norepinefrina nakon 6 i 9 mjeseci. U ovoj studiji su upotrijebljeni Wistar štakori, kojima je u sličnoj dobi i koncentraciji STZ-a induciran dijabetes. Uočili su denervaciju 6 mjeseci nakon indukcije, koja se intenzivirala proksimalno prema distalno, da bi 9 mjeseci nakon indukcije denervacija bila izražena proksimalno i distalno (123).

Promatrajući ukupnu inervaciju srca kroz prva dva mjeseca bolesti, možemo primijetiti da se gustoća terminala u pojedinim regijama srca dijabetičkih životinja ne razlikuje znatno od kontrolnih, iako su značajne razlike uočene kada se promatraju sve regije zajedno. Znači da je to razdoblje u kojem se otvara mogućnost za preventivno djelovanje, poglavito zbog visoke incidencije smrti zbog infarkta miokarda u pacijenata sa dijabetičkom neuropatijom (124).

Autonomna neuropatija nastaje postupno, znakovi nastanka su često godinama prikriveni kompenzatornim mehanizmima, stoga je mogućnost detekcije ranih komplikacija važna, kako bi se moglo terapijski djelovati (125). Rezultati naše studije bi mogli biti odraz upravo tih kompenzatornih mehanizama.

Rezultati pokazuju da NF200 pozitivna vlakna imaju dvostruko veću površinu od TH pozitivnih vlakana, što bi moglo biti zbog njihove deblje mijelinske ovojnice (126), kao i veće gustoće. Značajne razlike između dijabetičkih i kontrolnih skupina kod NF200 pozitivnih vlakana su pronađene jedino 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa, a kod TH pozitivnih vlakana 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije, promatrajući sve regije klijetki zajedno. Promjene u ukupnoj gustoći NF200 i TH pozitivnih vlakana dosljedne su promjenama koje smo pronašli kod PGP9.5 pozitivnih vlakana, gdje je nakon 2 tjedna od indukcije uočen izražen porast kod dijabetičkih životinja ($p<0.001$), kao i nakon 2 mjeseca ($p<0.05$).

Iako je 2 tjedna nakon indukcije bolesti kod dijabetičkih životinja pronađen porast površine NF200 pozitivnih vlakana, promatrajući pojedine regije, uzorak je nepravilan, čak i oprečan. Lijeva stijenka lijeve klijetke, inerventrikularni septum i desna klijetka bilježe porast površine NF200 pozitivnih vlakana kod dijabetičkih životinja. Zanimljivo je da prednja stijenka lijeve klijetke dijabetičkih životinja nakon 2 tjedna ima značajno smanjenje površine NF200

pozitivnih vlakana u odnosu na kontrolnu skupinu. Ista promjena se u prednjoj stijenci događa i 6 mjeseci nakon indukcije bolesti, kada ponovno dolazi do smanjenja ukupne površine NF200 pozitivnih vlakana u odnosu na kontrolnu skupinu, dok 2 mjeseca i 12 mjeseci nema značajne razlike između dijabetičkih i kontrolnih skupina. Dakle, ponovno imamo uzorak bifazičnih promjena inervacije. Rezultat je posebno zanimljiv ako uzmemo u obzir činjenicu da je prednja stijenka često pogođena infarktom miokada (9), stoga bi ovaj rezultat mogao biti jedno od objašnjenja zašto se javlja tiha ishemija srca kod DM-a. U stražnjoj stijenci ventrikula smo također evidentirali smanjenje površine NF200 pozitivnih vlakana, no samo 6 mjeseci i 12 mjeseci nakon indukcije, dok nakon 2 mjeseca imamo veću površinu NF200 pozitivnih vlakana u dijabetičkih životinja. Kod dijabetičkih životinja u drugim regijama klijetke u svim zadanim vremenskim razdobljima pronađena je značajno veća površina NF200 pozitivnih vlakana, iako je nije bilo kada bi promatrali ukupnu površinu za razdoblja od 2 mjeseca, 6 mjeseci i 12 mjeseci, izuzev značajne razlike u razdoblju od 2 tjedna. U razdoblju od 2 mjeseca nakon indukcije bolesti, smanjenje ukupne površine NF200 pozitivnih vlakana uz povećanje inervacije stražnje stijenke su jedine promjene koje su pronađene u ovom vremenskom razdoblju za NF200 pozitivna vlakna. Nakon 6 i 12 mjeseci ponovno se vide heterogene promjene tako da izuzev opisanih denervacija, u pojedinim regijama kao što je desna klijetka za oba navedena razdoblja i interventrikularni septum za razdoblje od 6 mjeseci, dolazi do povećanja površine NF200 vlakana kod dijabetičkih skupina. Ukupno gledajući, možemo primijetiti da lijeva klijetka ima bifazičan uzorak osjetne inervacije u različitim stadijima DM-a; u ranom stadiju (2 tjedna) može se vidjeti porast u lijevoj stijenci lijeve klijetke, dok u kasnijim stadijima (6 i 12 mjeseci nakon indukcije), dolazi do smanjenja gustoće NF200 pozitivnih vlakana u lijevoj stijenci lijeve klijetke (12 mjeseci) i u stražnjoj stijenci lijeve klijetke (6 i 12 mjeseci). Navedene promjene su u skladu sa denervacijom lijeve klijetke uočenih kod dijabetičkih pacijenata (127). Najizraženije i najdosljednije promjene u povećanju površine NF200 pozitivnih vlakana tako ima desna klijetka, koja evidentira značajan porast u razdobljima od 2 tjedna, 6 mjeseci i 12 mjeseci. Pronađene promjene koreliraju sa promjenama PGP9.5 pozitivnih vlakana koje smo pronašli u desnoj klijetki 12 mjeseci nakon indukcije. Ovi rezultati bi mogli doprinijeti boljem razumijevanju utjecaja dijabetesa na funkciju desne klijetke, obzirom da su podaci nedostatni, a dijabetes dokazano oštećuje njegovu funkciju, pritom stvarajući podlogu za zatajenje srca, aritmije i iznenadnu smrt (128, 129).

NF200 je adekvatan biljeg za mijelinizirana vlakna osjetnih neurona svih vrsta (130), koji je u srcu pronađen više u lijevoj nego u desnoj klijetci (4, 16). Promjene koje su do sada istražene

o NF200 pozitivnim vlaknima u srcu kod dijabetesa su manjkave. U studiji na humanim srcima osoba koje su bolovale od dijabetesa čija su tkiva uzeta posmrtno, nije pronađena značajna razlika u NF200 pozitivnim vlaknima u odnosu na kontrolne skupine (89). Brojnije su studije o promjenama osjetnih vlakana u spinalnim ganglijima i nodoznom gangliju kod dijabetesa. Kod zdravih srca čak oko polovine osjetnih vlakana koja odlaze u nodozni ganglij su NF200 pozitivna vlakna, više iz lijeve klijetke nego iz desne (16). NF200 pozitivna vlakna srca izuzev u nodozni ganglij, odlaze i u spinalni ganglij, također više iz lijeve klijetke u odnosu na desnu (4). Promatrana je promjena osjetne inervacije u lumbalnim spinalnim ganglijima kod Sprague-Dawley štakora kojima je induciran dijabetes, a rezultati su pokazali heterogene promjene. Izolektin B vlakna tako pokazuju smanjen broj 14 do 28 dana nakon indukcije šećerne bolesti, dok CGRP pozitivnih vlakana ima značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu u istom vremenskom razdoblju. Kolera B toksin pozitivni neuroni su bili značajno brojniji u odnosu na kontrolnu skupinu (126), što znači da glavnina osjetnih vlakana pod utjecajem dijabetesa reagira porastom, upravo kao NF200 pozitivna vlakna u srcu, što je bio slučaj u našoj studiji.

Osjetni neuroni promatrani u humanim spinalnim ganglijima pod utjecajem DM-a se povećavaju i sadržavaju veliki broj neurofilamenata. Iste promjene se događaju starenjem, no suptilnije su izražene, što vodi zaključku da su odgovor i mehanizmi obrane na oštećenje jednaki, bez obzira na uzrok oštećenja (131). Osjetna inervacija srca kod dijabetesa je istraživana većinom korištenjem CGRP biljega, gdje je utvrđena prvo povećana razina CGRP-a u klijetkama i pretklijetkama 4 tjedna od indukcije bolesti (87) potom smanjena u miokardu kao i spinalnim ganglijima nakon 8, odnosno 16 tjedana od indukcije DM-a (87, 132), a blagi porast CGRP kod DM-a je evidentiran u nodoznom gangliju, kamo odlaze aferentna vlakna vagusa iz srca (133). Važno je napomenuti da CGRP izuzev što prenosi i regulira bolne podražaje, već ima brojne druge funkcije kao sto su vazodilatacija, protektivne uloge kod remodeliranja i ozljede krvnih žila i sl. (134), stoga nije sasvim adekvatna usporedba promjene razine CGRP-a sa promjenama NF200 kod dijabetesa. Promjene koje se odvijaju kod DM-a u mijeliziranim vlaknima se povezuju sa izražajem gena kod DM-a, jer u studiji u kojoj su se analizirali suralni živac te neurofilament i tubulin mRNK kod dijabetesa, nije zabilježena promjena 2 mjeseca od indukcije bolesti ni u jednom od navedenih promatranih parametara, dok nakon 6 mjeseci dolazi do smanjenja mRNK za neurofilament i tubulin, kao i smanjenje broja neurofilamenata i gustoće unutar mijeliziranih vlakana (135). Podloga u promjenama osjetnih vlakana kod DM-a bi mogla biti zbog utjecaja hiperglikemije na neuralni čimbenik rasta (engl. neural growth factor, NGF) čija uloga je esencijalna u razvoju neuralnih vlakana, a

njegova se koncentracija također mijenja pod utjecajem DM-a (88, 136). Ieda je proučavao korelaciju između promjena NGF-a i osjetne inervacije kod dijabetičkih miševa. Dokazao je da je NGF ključan za razvoj osjetne inervacije, a da DM reducira proizvodnju NGF-a, zbog čega dolazi do degeneracije osjetnih vlakana. Opisane promjene su se dogodile 16 tjedana nakon indukcije, dok nakon 8 tjedana nije bilo značajne razlike (88). Hellweg je promatrao druge vremenske intervale u studiji na štakorskom modelu dijabetesa (Sprague-Dawley štakori) i dokazao da u ranim stadijima (nekoliko tjedana od indukcije) dolazi do porasta NGF-a, da bi u kasnijim stadijima (12-24 tjedna) došlo do smanjenja. Navedene promjene NGF-a bi mogle biti objašnjenje povećanja osjetne inervacije, a potom degeneracije u našem istraživanju i veza sa tihom srčanom ishemijom (80, 137). Važan aspekt u promjenama osjetnih živaca kod DM-a je i promjena njihove funkcije, jer u studijama na miševima kojima je induciran DM, dolazi do oštećenja funkcije perifernih živaca i osjeta kože 4-6 tjedana nakon indukcije bolesti (138). Tiha ishemija tako može biti rezultat i oštećene funkcije i kompenzatorne proliferacije u ranim stadijima bolesti ili smanjenja gustoće vlakana u kasnijoj fazi bolesti. Dokazali smo da u ranim stadijima DM-a (2 tjedna) gustoća NF200 pozitivnih vlakana je signifikantno veća u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu sa promjenama gustoće vlakana koji su PGP9.5 pozitivni, no također smo dokazali da u lijevoj klijetki dolazi do ekstenzivne osjetne denervacije u kasnijim stadijima bolesti, naspram desne klijetke, gdje osjetna inervacije progresivno postaje gušća u svim stadijima bolesti. Promjene osjetne inervacije u srcu, izuzev što su bitne u prijenosu boli i zaštiti kod ishemije, prikupljanjem informacija utječu na finu kontrolu rada srca, održavanja tlaka i volumena krvi, zasićenosti kisikom, stoga nije zanemariva promjena broja, morfologije i funkcije osjetnih vlakana. Naša saznanja su doprinos boljem razumijevanju utjecaja šećerne bolesti na osjetnu inervaciju, te upućuju na važnost preventivnog djelovanja u ranim fazama bolesti, kako bi se spriječile daljnje promjene.

Simpatička inervacija je također bila promijenjena pod utjecajem DM-a. Porast površine TH pozitivnih vlakana se dogodio u ranim stadijima bolesti, u razdobljima od 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije bolesti, dok u kasnim stadijima 6 i 12 mjeseci nakon indukcije nije bilo značajne razlike, promatrajući zajedno sve regije klijetki, što odgovara porastu ukupne površine panneuronalnog biljega PGP9.5 i potvrđuje dobiveni rezultat. U pojedinim regijama srca nije bilo pravilnog uzorka promjena. Pad gustoće TH pozitivnih vlakana je uočen u interventrikularnom septumu nakon 6 mjeseci, a porast u desnoj klijetki nakon 12 mjeseci. Slično promjenama kod osjetne inervacije, u desnoj klijetki su promjene najdosljednije. Rezultati naše studije su u skladu s Feltenovom studijom (139), koja je pokazala povišene razine

norepinefrina kod Sprague–Dawley štakora kojima je induciran dijabetes. U navedenoj studiji se potvrđuje da je utjecaj šećerne bolesti najizraženiji u ranoj fazi bolesti, obzirom da je u toj studiji štakorima starosti 1, 2, 3 i 4 mjeseca inducirana bolest, a rezultat je bio povećanje razina norepinefrina 1 mjesec nakon indukcije. Povišene razine su ostale i 2 mjeseca nakon indukcije, da bi uslijedio pad 4 mjeseca nakon indukcije. Rezultat je bio isti neovisno u kojoj dobi je štakorima induciran DM. Zaključak je da rana faza STZ induciranog dijabetesa može biti vrijeme u kojoj se javljaju promjene koje kasnije vode crpljenju zaštitnih mehanizama i degeneraciji. Promjene koje se događaju u simpatičkoj inervaciji pod utjecajem šećerne bolesti mogu dovesti do aritmija i smrtnog ishoda (140). Također, uočena je veća incidencija smrti zbog infarkta miokarda u pacijenata s autonomnom neuropatijom (141, 142). Frekvencija srca, varijabilnost krvnog tlaka, kao i iznenadna srčana smrt u pacijenata sa DM-om, su posljedica oštećenja simpatičke, parasimpatičke i osjetne funkcije srca. Poznato je da u ranim stadijima DM-a dolazi do porasta tirozin hidroksilaze u miokardu atrija utvrđene ELISA-om kod srca štakora kojima je induciran DM (80). Iako bi ovaj porast mogao biti zbog akumulacije u perifernim vlaknima, naša studija govori u prilog tome da do ovih promjena dolazi zbog proliferacije vlakana. Slične promjene uočila je i Svigrelova, iako je promatrala razine norepinefrina u srcima dijabetičkih štakora u drugačijim vremenskim intervalima. Razine norepinefrina su bile povišene 1 mjesec nakon indukcije, a snižene 2, 4, 6, 9 mjeseci, da bi nakon 12 mjeseci dosezale 60% kontrolnih vrijednosti (83). Akiyama sa suradnicima nije pronašao razliku u razini norepinefrina 2 i 4 tjedan od indukcije bolesti, dok je nakon 8 tjedna razina znatno porasla u odnosu na kontrolnu skupinu. Ta studija je također pokazala kako inzulin normalizira promjene razine norepinefrina uzrokovane hiperglikemijom (143). Hilsted je uočio smanjenje razine noradrenalina u plazmi pacijenata sa sigurnim znacima dijabetičke neuropatije kod dugotrajnog dijabetesa (144).

STZ-om induciran dijabetes u štakora je prikladan model za ljudsku simpatičku denervaciju, jer slično kao kod pacijenata sa dijabetesom, uočena je denervacija proksimalno prema distalno (73, 127). Međutim, naši rezultati su tek djelomično u skladu s rezultatima Schmida i suradnika, koji su našli drastičnu simpatičku denervaciju kod štakora 6 i 9 mjeseci nakon indukcije dijabetesa pomoću C-11 hidroksiefedrina koji je analog simpatičkih biljega (73). Iako su u navedenoj studiji koristili iste doze za indukciju bolesti, kao i štakore iste dobi, razlika u rezultatima može biti jer su u studiji korišteni štakori drugoj soja (Wistar), kao i drugačija tehnika obilježavanja simpatičkih vlakana.

Uočene promjene površine simpatičkih vlakana, koja je u padu nakon inicijalnog porasta u ranim stadijima, mogu se barem djelomično objasniti promjenama u izražaju NGF-a, za kojeg se zna da u radnim stadijima šećerne bolesti dolazi do pojačanog izražaja, no u kasnijima fazama izražaj slabi, poglavito nakon 6 mjeseci (126, 136). Međutim, mehanizam promjena kod izražaja živčanih završetaka nije ovisan tek o jednom čimbeniku, već je to složen mehanizam u kojim, između ostalih, sudjeluje i Sem3a (*engl. Class 3 secreted semaphorin*), koji djelovanjem oprečnim od NGF-a sprječava prekomjerno bujanje vlakana, te održava ravnotežu (124, 137). Odnosi navedenih čimbenika rasta su predmet novijih istraživanja, te moguće objašnjenje dinamike promjena koje smo uočili u našem istraživanju.

Porast norepinefrina je također uočen u studiji koja je proučavala inervaciju srca i promjene srčanog ritma u pacijenata sa transplantiranim srcima (145), kao i nakon oštećenja miokarda infarktom (9, 137, 146), sugerirajući da bi to mogao biti zaštitni mehanizam na oštećenje, neovisno o uzroku. Ventrikularne aritmije su česte u navedenim stanjima, gdje dolazi do prekomjerne simpatičke inervacije, čime simpatička inervacija dominira nad parasimpatičkom (9, 146), što je slučaj i kod starenja (147). Xuan je u svom istraživanju na dijabetičkim štakorima pronašao prvo porast simpatičke inervacije, potom smanjenje, kao i mi, no uz to je uočio parasimpatičku denervaciju već u ranim stadijima bolesti, uz daljnju progresiju u kasnijim stadijima bolesti, navodeći na zaključak da je upravo ovaj obrazac promjena podloga razvoju aritmija kod DM-a (81).

Starenjem se u miokardu događaju brojne promjene kao što je degeneracija miofibrila, smanjenje debljine stjenke desnog ventrikula, bujanje vezivnog tkiva i povećanje mišićne mase lijevog ventrikula, kao i značajno smanjenje broja živčanih terminala u miokardu kod starih životinja naspram mladih (148). U toj studiji su promatrane životinje dobi 3-5 tjedana naspram onih starosti 6 mjeseci. Pokusne skupine u našoj studiji su promatrane u vremenu od 2 tjedna do 12 mjeseci, tako da smo uz utjecaj DM-a na inervaciju, mogli promatrati i promjene koje se događaju starenjem na osjetnu i simpatičku, kao i ukupnu inervaciju. U usporedbi sa ljudskim životnim vijekom, najstarija grupa naših životinja dosegla je dob od 30 godina (149, 150). Životinje su imale 8 tjedana kada im je inducirana šećerna bolest, tako da su u studiji bile starosti 10 tjedana, 4 mjeseca, 8 mjeseci i 14 mjeseci. Panneuronalni biljeg PGP9.5 ima sličan uzorak u promjenama obilježenih vlakana i za dijabetičku i kontrolnu skupinu. Razdoblje od 6 mjeseci je obilježeno smanjenjem gustoće inervacije u odnosu na razdoblja od 2 tjedna i 2 mjeseca, da bi došlo do porasta u razdoblju od 12 mjeseci od indukcije, kada su životinje imale 14 mjeseci. Ove promjene su tek djelomično rezultat promjena NF200 i TH pozitivnih vlakana,

jer kod kontrolnih životinja kod maturacije je zabilježen tek porast NF200 pozitivnih vlakana za razdoblje od 12 mjeseci, odnosno kad su životinje bile stare 14 mjeseci. TH pozitivna vlakna kod kontrolnih životinja se nisu značajno mijenjala starenjem. Pretpostavljamo da je promjena panneuronalnog biljega PGP9.5 starenjem odraz promjena osjetnih vlakana, uz promjene u vlaknima koja nisu bila predmet našeg istraživanja u ovoj studiji. Postoje, također, rezultati oprečni našima, koji govore u prilog povećanju aktivnosti simpatikusa, naspram slabljenju aktivnosti parasimpatikusa starenjem, što bi moglo biti kompenzatorni mehanizam na promjene osjetljivosti baroreceptora starenjem (147). Razlike u rezultatima su vjerojatno u tome što su naši štakori tek u prosječnoj polovici životnog vijeka, stoga još nije došlo do promjena u simpatičkoj inervaciji koja se pojavljuje u staroj dobi. Promjena NF200 pozitivnih vlakana starenjem u našoj studiji se može nadovezati na rezultate studije u kojoj su promatrane promjene spinalnih NF200 pozitivnih neurona srca (151), gdje je uočeno smanjenje izražaja NF200 pozitivnih neurona starenjem. Iako su rezultati oprečni, štakori su u navedenoj studiji promatrani u dobi od 2 godine, što je ipak veliki vremenski raspon u odnosu na 14 mjeseci što je naša najstarija dobna skupina. Također, promatrani su samo spinalni aferentni neuroni, s tim da se najveći dio aferentnih neurona koji inerviraju srce ipak nalazi u nodoznom gangliju (152), naspram naše studije u kojoj su promatrani ukupni NF200 pozitivni neuroni u ventrikulima, no kronološki, zajedno mogu dati potpuniju sliku na promjene koje se pojavljuju starenjem.

Također, pronašli smo znakove razvoja kardiomiopatije, u dijabetičkim skupinama došlo je do zadebljanja stjenke lijevog ventrikula i povećanja kardiomiocita u odnosu na kontrolne skupine. Studije na štakorskom modelu dijabetesa potvrđuju ove rezultate. Becher i suradnici su uočili slabljenje sistoličke i dijastoličke funkcije lijevog srca već 2 tjedna od indukcije bolesti uz progresiju nakon 6 tjedana, uz povećanje broja upalnih stanica, fibroze i kolagena u miokardu (153). Guido i suradnici su imali isti nalaz u lijevoj klijetki 8 tjedana od indukcije dijabetesa štakorima (154), što i u vidu proučavanja kardiomiopatije potvrđuje adekvatnost štakorskog modela dijabetesa.

Životinjski modeli su učestalo korišteni za proučavanje šećerne bolesti. Nedavne studije dokazuju da promjene ljudskog srca kod starenja i DM uvelike nalikuju onima kod glodavaca, poglavito štakora (155, 156), stoga rezultati ove studije mogu biti relevantni za patofiziologiju navedenih promjena kod ljudi. Srčana inervacija koju smo proučavali, bilo da se radi o simpatičkim, osjetnim ili ukupnim živčanim završetcima, prolazi različite dinamičke promjene i kod dijabetičkih kao i kontrolnih životinja, koje su poglavito ovisne o vremenu. Rana faza bolesti je ključna za promjene kod šećerne bolesti. Uzorak promjena inervacije se razlikuje u

klijetkama, a zahvaćene su i desna i lijeva klijetka. U zdravih životinja sazrijevanjem se mijenja jedino osjetna inervacija, nasuprot situacije kod dijabetičkih životinja. Malo je radova o promjenama osjetne inervacije srca, stoga je uzorak promjena kod DM i starenja, koji smo pronašli u našem istraživanju doprinos boljem razumijevanju patofiziologije dijabetičke neuropatije, kao i starenja. Glavnina promjena pod utjecajem hiperglikemije pojavljuje se u razdoblju od 2 mjeseca od početka bolesti, stoga rezultati upućuju na važnost ranog liječenja i prevencije (157, 158).

6. ZAKLJUČCI

- kvantitativne promjene živčanih vlakana pod utjecajem šećerne bolesti javljaju se u ranim stadijima bolesti

-kvantitativne promjene živčanih vlakana pod utjecajem šećerne bolesti zahvaćaju sve tipove vlakana

-šećerna bolest dovodi do porasta ukupne površine živčanih vlakana 2 tjedna (PGP9.5, NF200 i TH) i 2 mjeseca od početka bolesti (PGP9.5 i TH)

-promjene koje se javljaju starenjem nemaju pravilan uzorak za pojedene vrste živčanih vlakana kao ni u pojedinim regijama klijetki

-šećerna bolest je u klijetkama izazvala promjene karakteristične za dijabetičku kardiomiopatiju

7. SAŽETAK

Šećerna bolest (DM) ima brojne kronične komplikacije, kao posljedicu hiperglikemije, među kojima je i dijabetička autonomna neuropatija (DAN, odnosno srčane autonomne neuropatije (CAN). Rizik razvoja CAN-a su razvoj aritmija, nijeme ishemije i iznenadne srčane smrti, stoga je cilj ovog istraživanja bio pomoći razumjeti koje promjene u živčanim završetcima u srcu dovode do razvoja navedenih stanja. Za istraživanje je korišten štakorski model DM1 izazvan streptozotocinom. Proučavane su životinje različite starosti, ovisno o trajanju DM1. Imunohistokemijskim bojanjima su lokalizirani živčani završetci u presjecima klijetki, korišteni su PGP9.5 kao panneuralni biljeg, a NF200 kao biljeg osjetne i TH kao biljeg simpatičke inervacije. Analizirali smo i promjene inervacije koje se odvijaju starenjem. Ustanovili smo da se glavnina promjena pod utjecajem DM1 javlja u ranim stadijima bolesti, te da je karakterizirana povećanjem ukupne površine vlakana. Površina NF200 pozitivnih vlakana je bila povećana 2 tjedna, a površina PGP9.5 i TH pozitivnih vlakana 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije bolesti, u usporedbi sa kontrolnim skupinama. Promjene inervacije starenjem su pokazale heterogen uzorak u klijetkama za sve tipove vlakana. Dobiveni rezultati navode na zaključak da je za prevenciju oštećenja živčanih vlakana kod DM1 važna početna faza bolesti, kao i rano terapijsko djelovanje.

8. SUMMARY

Diabetes mellitus (DM), has various chronic complications, as a consequence of hyperglycemia, among which is diabetic autonomic neuropathy (DAN), respectively cardiac autonomic neuropathy (CAN). Risk of CAN are development of arrhythmias, silent ischemia and sudden cardiac death, therefore aim of this study was to help to understand which changes in nerve terminals lead to said states. Rat model of streptozotocine (STZ) induced DM1 was used in study. Experimental animals of different ages were studied, .2 weeks, 2, 6 and 12 months, depending of duration of DM1. Immunohistochemistry methods were used to determine nerve terminals in ventricle sections, PGP9.5 as general neuronal marker, NF200 as sensory nerve marker, TH as sympathetic nerve marker. Changes in nerve terminals during maturation were also studied. Majority of all changes happen in early onset of DM1, and it is characterized by increase of surface of nerve terminals. NF200 positive nerve terminals were increased after 2 weeks, and PGP9.5 and TH positive nerve terminals were increased after 2 weeks and 2 months, compared to control groups. Changes in nerve terminals related to maturation had heterogeneous pattern. We conclude that changes in neural terminals occur in early stages of DM1 and that period is essential in prevention.

9. LITERATURA

1. Hopkins DA, Armour JA. Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. J Com Neurol. 1984;229:186-98.
2. Armour JA, Collier K, Kember G, Ardell JL. Differential selectivity of cardiac neurons in separate intrathoracic autonomic ganglia. Am J Physiol. 1998;274:939-49.
3. Zhuo H, Ichikawa H, Helke CJ. Neurochemistry of the nodose ganglion. Prog Neurobiol. 1997;52:79-107.
4. Guic MM, Kosta V, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Characterization of spinal afferent neurons projecting to different chambers of the rat heart. Neurosci Lett. 2010;469:314-8.
5. Armour JA. Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. Expe Physiol. 2008;93:165-76.
6. Horackova M, Armour JA. ANG II modifies cardiomyocyte function via extracardiac and intracardiac neurons: in situ and in vitro studies. Am J Physiol. 1997;272:766-75.
7. Chapleau MW, Cunningham JT, Sullivan MJ, Wachtel RE, Abboud FM. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. Hypertension. 1995;26:341-7.
8. Monteiro LM, Vasques-Novoa F, Ferreira L, Pinto-do OP, Nascimento DS. Restoring heart function and electrical integrity: closing the circuit. NPJ Regen Med. 2017;2:9.
9. Culic V. Inferior myocardial infarction scars could be more arrhythmogenic than anterior ones. Europace. 2010;12:597.
10. Kawano H, Okada R, Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. Heart Vessels. 2003;18:32-9.
11. Yokoyama T, Lee JK, Miwa K et al. Quantification of sympathetic hyperinnervation and denervation after myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. PloS one. 2017;12:0182072.
12. Petraitiene V, Pauza DH, Benetis R. Distribution of adrenergic and cholinergic nerve fibres within intrinsic nerves at the level of the human heart hilum. Eur J Cardiothorac Surg. 2014;45:1097-105.
13. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K et al. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. J Anat. 2016;228:26-46.
14. Slavikova J, Tucek S. Choline acetyltransferase in the heart of adult rats. Pflugers Archiv : Eur J Physiol. 1982;392:225-9.

15. Yasuhara O, Matsuo A, Bellier JP, Aimi Y. Demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type in the rat heart. J Histochem Cytochem. 2007;55:287-99.
16. Kosta V, Guic MM, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Immunohistochemical characteristics of neurons in nodose ganglia projecting to the different chambers of the rat heart. Autonom Neurosci. 2010;155:33-8.
17. Bissinger A. Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That? J Diabetes res. 2017;2017:5374176.
18. Bailes BK. Diabetes mellitus and its chronic complications. AORN J. 2002;76:266-76.
19. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 1998;15:539-53.
20. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2014;37 Suppl 1:S81-90.
21. Yang Y, Chan L. Monogenic Diabetes: What It Teaches Us on the Common Forms of Type 1 and Type 2 Diabetes. Endocr Rev. 2016;37:190-222.
22. Hotta-Iwamura C, Tarbell KV. Type 1 diabetes genetic susceptibility and dendritic cell function: potential targets for treatment. J Leukoc Biol. 2016;100:65-80.
23. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. Autoimmunity. 2008;41:11-8.
24. Temneanu OR, Trandafir LM, Purcarea MR. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents: a relatively new clinical problem within pediatric practice. J Med Life. 2016;9:235-9.
25. Mirghani Dirar A, Doupis J. Gestational diabetes from A to Z. World J Diabet. 2017;8:489-511.
26. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KG. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. Diabet Med. 2002;19:708-23.
27. Kaikini AA, Kanchan DM, Nerurkar UN, Sathaye S. Targeting Mitochondrial Dysfunction for the Treatment of Diabetic Complications: Pharmacological Interventions through Natural Products. Pharmacognos Rev. 2017;11:128-35.
28. Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD. ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. BMJ. 2000;320:1062-6.
29. Gooch C, Podwall D. The diabetic neuropathies. Neurolog. 2004;10:311-22.

30. Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? J Diabet Investig. 2011;2:18-32.
31. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. Diabetes care. 1992;15:1902-25.
32. Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. Chem Biol Interact. 2015;234:261-73.
33. Ho EC, Lam KS, Chen YS et al. Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH2-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. Diabetes. 2006;55:1946-53.
34. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. Neuron. 2017;93:1296-313.
35. Grewal AS, Bhardwaj S, Pandita D, Lather V, Sekhon BS. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. Mini reviews in medicinal chemistry. 2016;16:120-62.
36. Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Ann NY Acad Sci. 2008;1126:76-80.
37. Eichberg J. Protein kinase C changes in diabetes: is the concept relevant to neuropathy? Int Rev Neurobiol. 2002;50:61-82.
38. Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. Circ Res. 2010;106:1319-31.
39. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. React oxyg species. 2016;1:9-21.
40. Sifuentes-Franco S, Padilla-Tejeda DE, Carrillo-Ibarra S, Miranda-Diaz AG. Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Function in Diabetic Nephropathy. Int J Endocrinol. 2018;2018:1875870.
41. Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. Int J Endocrinol. 2014;2014:674987.
42. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. Nat Rev Neurol. 2011;7:573-83.
43. Pacher P, Szabo C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. Cardiovasc Drugs Rev. 2007;25:235-60.

44. Li F, Szabo C, Pacher P et al. Evaluation of orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in streptozotocin-diabetic rat model of early peripheral neuropathy. Diabetologia. 2004;47:710-7.

45. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. Curr Med Chem. 2005;12:267-75.

46. Feng Y, Chen L, Luo Q et al. Involvement of microRNA-146a in diabetic peripheral neuropathy through the regulation of inflammation. Drug Des Devel Ther. 2018;12:171-177.

47. Kim H, Kim JJ, Yoon YS. Emerging therapy for diabetic neuropathy: cell therapy targeting vessels and nerves. Endocr metabol Immun. 2012;12:168-78.

48. Britland ST, Young RJ, Sharma AK, Clarke BF. Relationship of endoneurial capillary abnormalities to type and severity of diabetic polyneuropathy. Diabetes. 1990;39:909-13.

49. Saab AS, Tzvetanova ID, Nave KA. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. Curr Opin Neurobiol. 2013;23:1065-72.

50. Viader A, Sasaki Y, Kim S et al. Aberrant Schwann cell lipid metabolism linked to mitochondrial deficits leads to axon degeneration and neuropathy. Neuron. 2013;77:886-98.

51. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol. 2009;296:581-91.

52. Grote CW, Ryals JM, Wright DE. In vivo peripheral nervous system insulin signaling. J Periph Nerv. 2013;18:209-19.

53. Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. J Neurosci. 1986;6:1211-9.

54. Huang TJ, Price SA, Chilton L et al. Insulin prevents depolarization of the mitochondrial inner membrane in sensory neurons of type 1 diabetic rats in the presence of sustained hyperglycemia. Diabetes. 2003;52:2129-36.

55. Mielke JG, Wang YT. Insulin, synaptic function, and opportunities for neuroprotection. Prog Mol biol Translat Sci. 2011;98:133-86.

56. Zochodne DW. Mechanisms of diabetic neuron damage: Molecular pathways. Clin Neurol. 2014;126:379-99.

57. Grote CW, Groover AL, Ryals JM, Geiger PC, Feldman EL, Wright DE. Peripheral nervous system insulin resistance in ob/ob mice. Acta Neuropathol. 2013;1:15.

58. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. J Biol Chem. 2003;278:2896-902.

59. Grote CW, Morris JK, Ryals JM, Geiger PC, Wright DE. Insulin receptor substrate 2 expression and involvement in neuronal insulin resistance in diabetic neuropathy. Exp Diabetes Res. 2011;2011:212571.

60. Pittenger G, Vinik A. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. Exp Diabetes Res. 2003;4:271-85.

61. Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN et al. Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy. Am J Pathol. 2003;163:2077-91.

62. Alam U, Riley DR, Jugdey RS et al. Diabetic Neuropathy and Gait: A Review. Diabetes Th. 2017;8:1253-64.

63. Vracko R, Benditt EP. Manifestations of diabetes mellitus--their possible relationships to an underlying cell defect. A review. Am J Pathol. 1974;75:204-24.

64. Stevens MJ, Watkins PJ. Diabetic autonomic neuropathy. Acta Diabetol Lat. 1991;28:105-12.

65. Hashimoto M, Kuwahara M, Tsubone H, Sugano S. Diurnal variation of autonomic nervous activity in the rat: investigation by power spectral analysis of heart rate variability. J Electrocardiol. 1999;32:167-71.

66. Bellavere F, Balzani I, De Masi G et al. Power spectral analysis of heart-rate variations improves assessment of diabetic cardiac autonomic neuropathy. Diabetes. 1992;41:633-40.

67. Stevens MJ, Raffel DM, Allman KC et al. Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes: implications for enhanced cardiovascular risk. Circulation. 1998;98:961-8.

68. Fisher VL, Tahrani AA. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus: current perspectives. Diabetes Metab Syndr Obes. 2017;10:419-34.

69. Roth DA, White CD, Hamilton CD, Hall JL, Stanley WC. Adrenergic desensitization in left ventricle from streptozotocin diabetic swine. J Mol Cell Cardiol. 1995;27:2315-25.

70. Christoffersen C, Goetze JP, Bartels ED et al. Chamber-dependent expression of brain natriuretic peptide and its mRNA in normal and diabetic pig heart. Hypertension. 2002;40:54-60.

71. Kumar SD, Tay SS. Changes in peptidergic nerves in the atrioventricular valves of streptozotocin-induced diabetic rats: a confocal microscopy study. Anatom Rec. 2000;258:277-85.

72. Weihe E, Schutz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schafer MK, Eiden LE. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. J Comp Neurol. 2005;492:370-9.

73. Schmid H, Forman LA, Cao X, Sherman PS, Stevens MJ. Heterogeneous cardiac sympathetic denervation and decreased myocardial nerve growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for cardiac sympathetic dysinnervation complicating diabetes. Diabetes. 1999;48:603-8.

74. Gando S, Hattori Y, Kanno M. Altered cardiac adrenergic neurotransmission in streptozotocin-induced diabetic rats. Br J Pharmacol. 1993;109:1276-81.

75. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N et al. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. Heart rhythm. 2011;8:731-8.

76. Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. Cell Tissue res. 2003;314:337-50.

77. Kittnar O. Electrocardiographic changes in diabetes mellitus. Physiol Res. 2015;64 Suppl 5:S559-66.

78. Lin K, Wei L, Huang Z, Zeng Q. Combination of Ewing test, heart rate variability, and heart rate turbulence analysis for early diagnosis of diabetic cardiac autonomic neuropathy. Medicine. 2017;96:8296.

79. Schramm E, Wagner M, Nellessen U, Inselmann G. Ultrastructural changes of human cardiac atrial nerve endings in diabetes mellitus. Eur J Clin Invest. 2000;30:311-6.

80. Li X, Jiang YH, Jiang P et al. Analysis of Heart Rate Variability and Cardiac Autonomic Nerve Remodeling in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. Expe Clin Endocrinol Diabetes. 2015;123:272-81.

81. Xuan YL, Wang Y, Xue M et al. In rats the duration of diabetes influences its impact on cardiac autonomic innervations and electrophysiology. Autonom Neurosci. 2015;189:31-6.

82. Otake H, Suzuki H, Honda T, Maruyama Y. Influences of autonomic nervous system on atrial arrhythmogenic substrates and the incidence of atrial fibrillation in diabetic heart. Int Heart J. 2009;50:627-41.

83. Sviglerova J, Mudra J, Tonar Z, Slavikova J, Kuncova J. Alteration of the cardiac sympathetic innervation is modulated by duration of diabetes in female rats. Exp Diabetes Res. 2011;2011:835932.

84. Kuncova J, Slavikova J, Sviglerova J. Norepinephrine release in the heart atria of diabetic rats. Gen Physiol Biophys. 2003;22:397-410.

85. Wisniewska RJ, Wisniewski K. Interaction of cholecystokinin (CCK-8) with agonist and antagonist of beta-adrenergic receptors in circulatory system of diabetic rats. Pol J Pharmacol. 1996;48:293-7.

86. Mabe AM, Hoover DB. Remodeling of cardiac cholinergic innervation and control of heart rate in mice with streptozotocin-induced diabetes. Autonom Neurosci. 2011;162:24-31.
87. Chottova Dvorakova M, Kuncova J, Pfeil U et al. Cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetes involves intra-axonal accumulation of calcitonin gene-related peptide and altered expression of its receptor in rats. Neuroscience. 2005;134:51-8.
88. Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y et al. Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. Circulation. 2006;114:2351-63.
89. Park AM, Armin S, Azarbal A, Lai A, Chen PS, Fishbein MC. Distribution of cardiac nerves in patients with diabetes mellitus: an immunohistochemical postmortem study of human hearts. Cardiovasc Pathol. 2002;11:326-31.
90. Nozdrachev AD, Masliukov PM. [Neuropeptide Y and autonomic nervous system]. Zh Evoliut Biokh Fiziol. 2011;47:105-12. Russian.
91. Lindberger M, Schroder HD, Schultzberg M et al. Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. J Neurol Sci. 1989;93:289-96.
92. Li TP, Guo Z, Liu CJ, Sun T, Chen L, Zhao X. Association of down-regulation of calcitonin gene-related peptide and substance P with increase of myocardial vulnerability in diabetic neuropathic rats. Peptides. 2017;96:1-7.
93. Willars GB, Calcutt NA, Compton AM, Tomlinson DR, Keen P. Substance P levels in peripheral nerve, skin, atrial myocardium and gastrointestinal tract of rats with long-term diabetes mellitus. Effects of aldose reductase inhibition. J Neurol Sci. 1989;91:153-64.
94. Trachanas K, Sideris S, Aggeli C et al. Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment. Hellenic J Cardiol. 2014;55:411-21.
95. Spector KS. Diabetic cardiomyopathy. Clin Cardiol. 1998;21:885-7.
96. Lee WS, Kim J. Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going. Korean J Intern Med. 2017;32:404-21.
97. Brock C, Brock B, Pedersen AG, Drewes AM, Jessen N, Farmer AD. Assessment of the cardiovascular and gastrointestinal autonomic complications of diabetes. World J Diabetes. 2016;7:321-32.
98. Guo C, Quobatari A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat. Neurogastroenterol Motil. 2004;16:335-45.
99. Uranga-Ocio JA, Bastus-Diez S, Delkader-Palacios D et al. Enteric neuropathy associated to diabetes mellitus. Rev Esp Enferm Dig. 2015;107:366-73.

100. Revicki DA, Rentz AM, Tack J et al. Responsiveness and interpretation of a symptom severity index specific to upper gastrointestinal disorders. Clin Gastroenterol Hepatol. 2004;2:769-77.

101. Illigens BM, Gibbons CH. Sweat testing to evaluate autonomic function. Clin Auton Res. 2009;19:79-87.

102. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. Diabetes care. 2010;33:2285-93.

103. Niakan E, Harati Y, Comstock JP. Diabetic autonomic neuropathy. Metabolism. 1986;35:224-34.

104. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. In vivo. 2009;23:245-58.

105. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. J Diabetes Res. 2016;2016:9051426.

106. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol res. 2001;50:537-46.

107. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. Indian J Clin Biochem. 2007;22:60-4.

108. Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. Cell. 1991;65:319-31.

109. Yorek MA. Alternatives to the Streptozotocin-Diabetic Rodent. Int Rev Neurobiol. 2016;127:89-112.

110. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MR. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep. 1963;29:91-8.

111. Davidson ME, Lang RJ. Pelviureteric peristaltic contractions in diabetic rats. J Smooth Muscle Res. 2007;43:145-55.

112. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. Lab Anim. 2011;45:131-40.

113. Schofield JN, Day IN, Thompson RJ, Edwards YH. PGP9.5, a ubiquitin C-terminal hydrolase; pattern of mRNA and protein expression during neural development in the mouse. Brain Res Dev Brain Res. 1995;85:229-38.

114. Lauweryns JM, Van Ranst L. Protein gene product 9.5 expression in the lungs of humans and other mammals. Immunocytochemical detection in neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells and nerves. Neurosci Lett. 1988;85:311-6.
115. Ramieri G, Anselmetti GC, Baracchi F et al. The innervation of human teeth and gingival epithelium as revealed by means of an antiserum for protein gene product 9.5 (PGP 9.5). Am J Anat. 1990;189:146-54.
116. Suburo AM, Wheatley SC, Horn DA et al. Intracellular redistribution of neuropeptides and secretory proteins during differentiation of neuronal cell lines. Neuroscience. 1992;46:881-9.
117. Menard CE, Durston M, Zherebitskaya E et al. Temporal dystrophic remodeling within the intrinsic cardiac nervous system of the streptozotocin-induced diabetic rat model. Acta Neuropathol Commun. 2014;2:60.
118. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. Annu Rev Biochem. 1971;40:465-500.
119. Forsgren S, Moravec M, Moravec J. Catecholamine-synthesizing enzymes and neuropeptides in rat heart epicardial ganglia; an immunohistochemical study. Histochem J. 1990;22:667-76.
120. Dahl D, Bignami A. Intermediate filaments in nervous tissue. Cell Muscle Motil. 1985;6:75-96.
121. Bergman E, Carlsson K, Liljeborg A, Manders E, Hokfelt T, Ulfhake B. Neuropeptides, nitric oxide synthase and GAP-43 in B4-binding and RT97 immunoreactive primary sensory neurons: normal distribution pattern and changes after peripheral nerve transection and aging. Brain Res. 1999;832:63-83.
122. Toth C, Brussee V, Cheng C, Zochodne DW. Diabetes mellitus and the sensory neuron. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2004;63:561-73.
123. Schmidt RE, Plurad SB, Modert CW. Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. Lab Invest. 1983;49:538-52.
124. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. Circ Res. 2015;116:2005-19.
125. Malpas SC, Maling TJ. Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. Diabetes. 1990;39:1177-81.
126. Kou ZZ, Li CY, Hu JC et al. Alterations in the neural circuits from peripheral afferents to the spinal cord: possible implications for diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. Front Neural Circ. 2014;8:6.

127. Stevens MJ, Dayanikli F, Raffel DM et al. Scintigraphic assessment of regionalized defects in myocardial sympathetic innervation and blood flow regulation in diabetic patients with autonomic neuropathy. J Am Coll Cardiol. 1998;31:1575-84.

128. Movahed MR, Milne N. Presence of biventricular dysfunction in patients with type II diabetes mellitus. Congest Heart Fail. 2007;13:78-80.

129. Eweda, II. Hypertension and Diabetes Mellitus: How Do They Affect the Right Ventricular Functions Individually and Together? J Cardiovasc Echog. 2017;27:88-92.

130. Hacker GW, Polak JM, Springall DR et al. Antibodies to neurofilament protein and other brain proteins reveal the innervation of peripheral organs. Histochem. 1985;82:581-93.

131. Schmidt RE, Dorsey D, Parvin CA, Beaudet LN, Plurad SB, Roth KA. Dystrophic axonal swellings develop as a function of age and diabetes in human dorsal root ganglia. J Neuropathol Exp Neurol. 1997;56:1028-43.

132. Sun T, Guo Z, Liu CJ et al. Preservation of CGRP in myocardium attenuates development of cardiac dysfunction in diabetic rats. Int J Cardiol. 2016;220:226-34.

133. Mistrova E, Wiegand S, Sviglerova J et al. Adrenomedullin and the calcitonin receptor-like receptor system mRNA expressions in the rat heart and sensory ganglia in experimentally-induced long-term diabetes. Gen Physiol Biophys. 2014;33:215-25.

134. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2014;94:1099-142.

135. Scott JN, Clark AW, Zochodne DW. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. Brain. 1999;122:2109-18.

136. Hellweg R, Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. J Neurosci Res. 1990;26:258-67.

137. Ieda M, Fukuda K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. Curr Cardiol Rev. 2009;5:289-95.

138. Lennertz RC, Medler KA, Bain JL, Wright DE, Stucky CL. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy. J Neurophysiol. 2011;106:905-14.

139. Felten SY, Peterson RG, Shea PA, Besch HR, Jr., Felten DL. Effects of streptozotocin diabetes on the noradrenergic innervation of the rat heart: a longitudinal histofluorescence and neurochemical study. Brain Res Bull. 1982;8:593-607.

140. Chen LS, Zhou S, Fishbein MC, Chen PS. New perspectives on the role of autonomic nervous system in the genesis of arrhythmias. J Cardiovasc Electrophysiol. 2007;18:123-7.
141. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. J Diabetes Invest. 2013;4:4-18.
142. Vinik AI, Erbas T. Diabetic autonomic neuropathy. Handb Clin Neurol. 2013;117:279-94.
143. Akiyama N, Okumura K, Watanabe Y et al. Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts. Role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy. Diabetes. 1989;38:231-6.
144. Hilsted J. Catecholamines and diabetic autonomic neuropathy. Diabet Med. 1995;12:296-7.
145. Cao JM, Fishbein MC, Han JB et al. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. Circulation. 2000;101:1960-9.
146. Li CY, Li YG. Cardiac Sympathetic Nerve Sprouting and Susceptibility to Ventricular Arrhythmias after Myocardial Infarction. Cardiol Res Pract. 2015;2015:698368.
147. Pfeifer MA, Weinberg CR, Cook D, Best JD, Reenan A, Halter JB. Differential changes of autonomic nervous system function with age in man. Am J Med. 1983;75:249-58.
148. Hewa-Geeganage S. Innervation of the rat ventricular myocardium: patterns of sympathetic, parasympathetic and sensory supply related to ageing. Department of Anatomy and Cell Biology. The University of Melbourne, Parkvile, Victoria, Australia. 2003.
149. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prevent Med. 2013;4:624-30.
150. Ferrari AU, Radaelli A, Centola M. Invited review: aging and the cardiovascular system. J Appl Physiol. 2003;95:2591-7.
151. Guic MM, Runtic B, Kosta V, Aljinovic J, Grkovic I. Age-related changes of neurochemically different subpopulations of cardiac spinal afferent neurons in rats. Exp Gerontol. 2013;48:774-7.
152. Hopkins DA, Armour JA. Ganglionic distribution of afferent neurons innervating the canine heart and cardiopulmonary nerves. J Auton Nerv Syst. 1989;26:213-22.
153. Becher PM, Lindner D, Frohlich M, Savvatis K, Westermann D, Tschope C. Assessment of cardiac inflammation and remodeling during the development of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in vivo: a time course analysis. Int J Mol Med. 2013;32:158-64.

154. Guido MC, Marques AF, Tavares ER, Tavares de Melo MD, Salemi VMC, Maranhao RC. The Effects of Diabetes Induction on the Rat Heart: Differences in Oxidative Stress, Inflammatory Cells, and Fibrosis between Subendocardial and Interstitial Myocardial Areas. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:5343972.

155. Lakatta EG, Sollott SJ. Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. Comp Biochem Physiol. 2002;132:699-721.

156. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. Circulation. 2003;107:346-54.

157. Won JC, Park TS. Recent Advances in Diagnostic Strategies for Diabetic Peripheral Neuropathy. Endocrinol Metab. 2016;31:230-8.

158. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. Diabetes care. 2005;28:956-62.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marija Baković

Adresa: Maka Dizdara 6A, Zadar

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Datum rođenja: 11. rujna 1984.

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Mobitel/Telefon: 091 922 0212

Elektronička pošta: marija.caran@gmail.com

OBRAZOVANJE:

1991. - 1999. Osnovna škola: Don Lovre Katić u Solinu

1999. - 2003. II. Jezična gimnazija u Splitu

2003. - 2009. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2011. - 2018. Poslijediplomski studij: "Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE)", Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

RADNO ISKUSTVO:

2010. - 2011. - pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Split

2011. - 2012. - rad u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (ordinacije obiteljske medicine)

2012. (veljača – prosinac) - asistentica na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta u Splitu

2012. - specijalizantica psihijatrije u Psihijatrijskoj bolnici Ugljan

NASTAVNI RAD:

2012.- Izvođenje nastave iz predmeta Anatomija za studente stručnih studija Sveučilišta u Splitu

2012- Izvođenje nastave iz predmeta Anatomija za studente svih smjerova na Medicinskom fakultetu u Splitu

JEZICI:

- Hrvatski jezik (materinski jezik)

- Engleski jezik (aktivno korištenje u govoru i pisanju)

- Njemački jezik (bazično korištenje u govoru i pisanju)

-Španjolski jezik (bazično korištenje u govoru i pisanju)

ZNANSTVENI INTERESI:

- inervacija srca

- povezanost inervacije srca sa starenjem i dijabetesom

- promjene autonomne inervacije

TEHNIČKE VJEŠTINE:

Imunohistokemijsko bojanje, tehnike perfuzije i fiksacije tkiva, rezanje blokova na mikrotomu, rezanje smrznutih rezova na kriostatu, rezanje na vibratomu, korištenje fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51) i digitalne kamere (Olympus DP71 kamera).

POZNAVANJE RAČUNALNIH PROGRAMA:

Microsoft Office paket (Word, Excel, Power Point, Outlook), EndNote, Adobe Photoshop, Image J, Cell A.

ČLANSTVO U PROFESIONALNIM ORGANIZACIJAMA:

2011. - Hrvatska liječnička komora

2015. - Hrvatski liječnički zbor

2018- Hrvatsko psihijatrijsko društvo, Sekcija mladih psihijatara i specijalizanata psihijatrije Hrvatske

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Bakovic M, Filipovic N, Ferhatovic Hamzic L, Kunac N, Zdrilic E, Vitlov Uljevic M, et al. Changes in neurofilament 200 and tyrosine hydroxylase expression in the cardiac innervation of diabetic rats during aging. Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology. 2018 Jan - Feb;32:38-43. PubMed PMID: 29175663.

2. Bakovic M, Juric Paic M, Zdrilic E, Vukojevic K, Ferhatovic L, Marin A, et al. Changes in cardiac innervation during maturation in long-term diabetes. Experimental gerontology. 2013 Dec;48(12):1473-8. PubMed PMID: 24140619.

Sudjelovanje na kongresima i simpozijima:

1. Poslijediplomski tečaj TMI III. kategorije „Kako napisati znanstveno-stručni rad: od ideje do publikacije“,13. lipnja 2012., Medicinsku fakultet u Splitu, Split, Hrvatska

2. Poslijediplomski tečaj TMI II. kategorije „Mentalno zdravlje u zajednici“, Zadar 20. travnja 2013.

3. 7. skup hrvatskih mladih liječnika i specijalizanata, Biograd n/m, 25-26. listopada 2013.

4. Poslijediplomski tečaj TMI II. kategorije „Česte bolesti u ordinaciji obiteljske medicine“, HLZ, Zadar, 7. studenog 2013.

5. The 7th Croatian Cochrane symposium, University of Split, School of Medicine, May 11, 2015., Split, Croatia