

Izražaj SATB1 i PTEN-a u bubrezima dijabetičkih štakora tijekom starenja

Delić Jukić, Ivana Kristina

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:171:675925>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Kristina Delić Jukić

**IZRAŽAJ SATB1 I PTEN-A U BUBREZIMA DIJABETIČKIH ŠTAKORA TIJEKOM
STARENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević

Split, 2018.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Kristina Delić Jukić

**IZRAŽAJ SATB1 I PTEN-A U BUBREZIMA DIJABETIČKIH ŠTAKORA TIJEKOM
STARENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević

Split, 2018.

Doktorska disertacija je izrađena u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Katarina Vukojević

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji, a posebno svom mužu Josipu, majci Mariji i sestri Danijeli. Oni su proživljavali svaki trenutak stvaranja ovog rada, pratili me na putu prema doktoratu znanosti, uvijek znali reći pravu riječ u pravo vrijeme. Svojom bezgraničnom podrškom, ljubavi, vjerom i ponosom su me pratili kroz ovaj dio životnoga puta.

Zahvala

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Katarini Vukojević na mentorstvu, stručnom vodstvu, nesebičnoj i bezgraničnoj pomoći koju mi je pružala cijelo vrijeme tijekom izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem joj na prenošenju znanja, iskustava, te stvaranju poticajne radne sredine.

Zahvaljujem i svim ostalim članovima Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu, te članovima Laboratorija za istraživanje ranog razvoja čovjeka na uspješnoj suradnji i financijskoj potpori istraživačkom radu u sklopu kojega je izrađena doktorska disertacija, a posebno prof. dr. sc. Mirni Saragi-Babić, prof. dr. sc. Marijanu Saragi, doc. dr. sc. Nataliji Filipović, doc. dr. sc. Sandri Kostić na savjetima i pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije, na stvaranju poticajne radne sredine, na raspravama vezanima za istraživački rad, čitanju teksta i preporukama za poboljšanje doktorske disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Draganu Ljutiću što mi svojim svakodnevnim radom i iskustvom u kliničkoj praksi pobuđuje istraživački duh i svijest za promicanje, trud i ulaganje u vlastito obrazovanje, zahvaljujem mu na savjetima, nesebičnoj pomoći i svakoj riječi podrške.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Anatomija bubrega.....	1
1.2 Fiziologija bubrega.....	1
1.3 Šećerna bolest.....	5
1.4 SATB1.....	15
1.5 PTEN.....	16
2. CILJ RADA I HIPOTEZA.....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1 Etika.....	19
3.2 Pokusne životinje.....	19
3.3 Indukcija i validacija šećerne bolesti.....	19
3.4 Sakupljanje tkiva i imunohistokemija.....	20
3.5 Statistika.....	21
4. REZULTATI.....	24
4.1 Ukupan broj SATB1 i PTEN pozitivnih stanica u bubrezima dijabetičke i kontrolne skupine štakora.....	24
4.2 SATB1 i PTEN pozitivne stanice u različitim dijelovima kontrolnih i dijabetičkih bubrega.....	26
4.3 SATB1 i PTEN pozitivne stanice u kontrolnim i dijabetičkim skupinama.....	26
4.4 Semi-kvantifikacija SATB1 i PTEN inteziteta bojanja kroz bubrege.....	31
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČAK.....	36
7. SAŽETAK.....	37
8. SUMMARY.....	38
9. LITERATURA.....	39
10. ŽIVOTOPIS.....	43

Popis oznaka i kratica

SATB1- tkivno specifična matriks vezajuća bjelančevina 1 bogata adenin-tiamin bazama

PTEN- fosfataza i tenzin homolog

Th- torakalni kralježak

L- lumbalni kralježak

n- živac

CO2- ugljikov dioksid

GFR/EGFR- brzina glomerularne filtracije

CT- kompjuterizirana tomografija

MRI- magnetska rezonanca

BMI- indeks tjelesne mase

MODY- dijabetes zrele dobi kod mladih

LADA- latentni autoimuni dijabetes odraslih osoba

IGF-1- inzulin sličan faktor rasta 1

TGF- β 1- transformirajući čimbenik rasta beta

cAMP- ciklički adenzin monofosfat

CTGF- čimbenik rasta vezivnog tkiva

OGTT- oralni glukoza tolerans test

HbA1c- glikirani hemoglobin

UACR- omjer albumina i kreatinina u urinu

UAER- omjer albumina u urinu

GWAS- svjetska studija o genomu

CUBN- gen koji kodira bjelančevinu kubilin

EMT- epitelno mezenhimalna tranzicija

PCR- polimeraza lančana reakcija

t- tjedan

m- mjesec

C- kontrolna skupina

DM- dijabetička skupina

PBS- fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

DAPI- 4', 6-diamidino-2-fenilindol

PT- proksimalni tubul

DT- distalni tubul

1. UVOD

1.1 Anatomija bubrega

Bubrezi su dva organa u ljudskom tijelu koji se nalaze visoko u trbušnoj šupljini, jedan na svakoj strani kralježnice, u retroperitonealnom prostoru (1). Desni bubreg je nešto manji i nalazi se nešto niže od lijevog bubrega zbog fiziološke asimetrije uzrokovane položajem jetre na desnoj strani trbušne šupljine (2). Lijevi bubreg je otprilike na razini Th12-L3, a desni se nalazi točno ispod dijafragme i straga prema jetri, te su gornji dijelovi bubrega zaštićeni 11. i 12. rebrom (2). Normalna veličina bubrega je 11 cm, a težina bubrega je negdje oko 125 i 179 grama (1). Kod žena je težina bubrega između 115 i 155 grama (2). Opskrbljeni su krvlju preko bubrežne arterije koja direktno izlazi iz abdominalne aorte, a krv iz bubrega izlazi iz bubrežne vene (1). Svaki bubreg ima konkavnu i konveksnu stranu, te je uvučeno područje na konkavnoj strani bubrežni hilus, gdje bubrežna arterija ulazi, a izlaze ureter i bubrežna vena (2). Iz svakog bubrega izlazi ureter, kroz koji mokraća dalje odlazi u mokraćni mjehur (1). Na vrhu svakog bubrega nalazi se nadbubrežna žlijezda, te je bubreg okružen s dva sloja masnog tkiva, perirenalno masno tkivo između bubrežne kapsule i fascije, te pararenalno masno tkivo iznad bubrežne fascije (2). Prednja površina bubrežne fascije je peritoneum, a stražnja je fascia transversalis (2). Tkivo bubrega se sastoji od bubrežne kore i bubrežne srži, te sadržava bubrežne piramide (2). Glavna strukturalna i funkcionalna jedinica bubrega je nefron (1). Svaki bubreg može sadržavati oko milijun nefrona koji obuhvaćaju koru i srž (1).

1.2 Fiziologija bubrega

Početni dio mjesta gdje se tekućina počinje filtrirati nalazi se u bubrežnoj kori, zatim slijede bubrežni tubuli koji se protežu kroz bubrežne piramide koje se nalaze u srži (2). Uloga nefrona je četverostruka, odgovoran je za filtraciju, reapsorpciju, sekreciju i ekskreciju (1). Bubreg tako sudjeluje u kontroli volumena i raspodjeli tjelesne tekućine, osmolalnosti, ravnoteži između kiselina i baza, odgovoran je za uklanjanje toksina i ravnomjernu razinu elektrolita u krvi (1). Krv u bubreg ulazi preko bubrežne arterije, te dolazi u glomerul gdje se filtrira otprilike 1/5 ukupnog volumena krvi (1). Određene tvari koje se filtriraju se opet reapsorbiraju, kao što su mokraćna kiselina, amonijak, vodik i kalij (1). Bubreg ima i druge funkcije u organizmu, osim filtriranja tjelesne tekućine (1). U bubrezima se stvara hormon eritropoetin i renin, te se prekursor vitamina D pretvara u aktivni oblik kalcitriol (1). Na vrhu svake bubrežne piramide tj. u papili mokraća prelazi u manje bubrežne čašice, zatim u velike čašice koje vode prema glavnim i pražnjenju mokraće u bubrežnu zdjelicu, što se pretvara u

ureter (2). Bubrežni hilum je okružen masnim i limfatičkim tkivom sa limfnim čvorovima (3). Masno tkivo u hilusu sa masnim tkivom koje ispunjava šupljinu čini bubrežni sinus (3). Bubrežni sinus s bubrežnom zdjelicom i čašicama odvaja ove strukture od bubrežnog tkiva srži (3). Bubrezi dobivaju 20 % ukupnog volumena krvi (3). Bubrežne arterije podijeljene su u segmentalne arterije koje se dalje dijele u interlobarne arterije koje ulaze u bubrežnu kapsulu te idu između bubrežnih piramida (3). Interlobarne arterije prenose krv preko arkuatnih krvnih žila koje prolaze između kore i srži (3). Arkuatne arterije donose krv interlobularnim arterijama koje ulaze u aferentne arteriole koje opskrbljuju krvlju glomerule (3). Nakon što se krv filtrira prolazi u venule zatim interlobularne vene (4). Vene imaju isti raspored kao i arterije, po redoslijedu slijede interlobularne, arkuatne, zatim interlobarne koje stvaraju bubrežnu venu koja izlazi iz bubrega (4). Bubrežna arterija daje granu za donju suprarenalnu arteriju radi opskrbe krvlju nadbubrežnu žlijezdu (4). Svaka bubrežna arterija se grana na prednju i stražnju granu, prednja grana se dijeli na apikalnu tj. gornju, anterosuperiornu, anteroinferiornu i inferiornu segmentalnu arteriju (4). Stražnja grana se nastavlja kao stražnja segmentalna arterija (4). Eferentne arteriole najprije idu do peritubularnih kapilara, zatim se nastavljaju prema interlobularnoj veni (4). Eferentne arteriole jukstaglomerularnog aparata se nastavljaju u vasu rectu (4). U bubregu se nalazi i splet živčanih vlakana takozvani bubrežni plexus, čija vlakna prolaze kroz bubrežne arterije da bi došla do svakog bubrega (4). Podražaj iz simpatičkog živčanog sustava izaziva vazokonstrikciju u bubregu, te je tako uzrokovan smanjen protok krvi kroz bubreg (4). Putem grana n. vagusa bubreg dobiva i parasimpatičke podražaje, no njihova uloga nije još potpuno jasna (5). Bol iz područja bubrega putuje živčanim vlaknima do Th10-11 razine u kralježničkoj moždini, te do odgovarajućeg dermatoma (5). Histološke strukture bubrega su: glomerul koji sadrži parijetalne stanice, podocyte, stanice proksimalnog tubula, Henleova petlja, stanice distalnog tubula, sabirni kanalići, te intersticijske stanice u bubregu (5). U ljudskim stanicama imamo otprilike oko 20.000 gena za kodiranje bjelančevina, a 70 % tih gena je izraženo u normalnim bubrezima (5). Točnije, 300 gena je izraženo u bubrezima, a oko 50 gena specifično za bubreg (5). Većina tih gena za kodiranje bjelančevina je izraženo u staničnoj membrani, te imaju ulogu prijenosnih bjelančevina (5). Bjelančevina koja je najviše izražena i specifična za bubreg je uromodulin, koji u mokraći sprječava rast i nakupljanje različitih mikroorganizama (5). Imamo i druge različite bjelančevine koje su izražene u bubregu, kao što su podocin i nefrin u glomerulima, zatim SLC22A8 u proksimalnim tubulima, kalbindin u distalnim tubulima, te akvaporin 2 u stanicama sabirnih kanalića (5). Ljudski bubreg se razvija od srednjeg mezoderma, te prolazi kroz faze razvijanja: pronefros,

mesonefros, metanefros (5). Preteća ljudskog bubrega je metanefros (5). Prva faza bubrežnog rada tj. filtriranje tjelesne tekućine se događa u glomerulu (5). To je proces u kojem se filtriraju tvari male molekularne težine radi stvaranja ultrafiltrata koji postaje mokraća, a tvari velike molekularne težine i bjelančevine se zadržavaju (5). Dnevno se filtrira otprilike 180 litara filtrata (6). Procesu pomaže i hidrostatski tlak na kapilarnim zidovima (6). Nakon filtracije slijedi reasorpcija u peritubularne kapilare (6). Reasorpcija se događa uz pomoć selektivnih receptora na luminalnoj strani stanične membrane (6). U proksimalnim tubulima se reasorbira 65 % vode, te glukoza u potpunosti ukoliko je u plazmi normalna razina glukoze (6). To se događa preko kotransportera Na/glukoza (6). Aminokiseline se također reasorbiraju u proksimalnom tubulu (6). U procesu sekrecije molekule se prenose iz peritubularnih kapilara kroz intersticijsku tekućinu, zatim kroz bubrežne tubularne stanice u ultrafiltrat (7). Zatim slijedi izlučivanje, ultrafiltrat prolazi iz nefrona do sabirnih kanalića, zatim u ureter (7). Sabirni kanalići također imaju ulogu i u reasorpciji (7). Bubrežni kanalici reguliraju homeostazu tjelesnih tekućina u organizmu, acido-baznu ravnotežu, koncentraciju elektrolita u krvi, utječe na volumen izvanstanične tekućine, te regulira krvni tlak (7). U ovoj homeostazi sudjeluju i drugi organi u tijelu, posebno organi endokrinološkog sustava (7). Hormoni na koje utječu su: renin, angiotenzin II, aldosteron, antidiuretski hormon, atrijski natriuretski peptid (7). Bubrežni kanalici izlučuju štetne tvari iz organizma kao što su metaboliti mokraćne kiseline i metaboliti nukleinske kiseline, zatim metaboliti katabolizma bjelančevina (7). Bubrežni kanalici i pluća zajedno održavaju acido-baznu ravnotežu organizma, održavaju pH vrijednost u granicama stabilne vrijednosti (7). Pluća doprinose ovoj ulozi tako što reguliraju koncentraciju CO₂, a bubrezi tako što reasorbiraju i regeneriraju bikarbonate iz urina, te izlučuju vodikove ione i anione kiselina u mokraću (7). Svaki značajniji porast osmolalnosti plazme šalje podražaj u hipotalamus, koji izravno komunicira s hipofizom (7). Povećanje osmolalnosti uzrokuje povećano lučenje antidiuretskog hormona, što dovodi do povećanja koncentracije urina (8). Antidiuretski hormon se veže na glavne stanice u sabirnim kanalicima, što uzrokuje translokaciju akvaporina na membranu, te se voda reasorbira preko vaze recte, što povećava volumen plazme u tijelu (8). Urea se izlučuje kao otpadna tvar iz bubrega, međutim kada je volumen plazme nizak i oslobođen je antidiuretski hormon akvaporini su propusni i za ureu (8). Ovo omogućuje da urea izlazi iz sabirnih kanalića, te se stvara hiperosmotska tekućina koja privlači vodu, urea zatim može opet biti filtrirana ovisno o prisutnosti antidiuretskog hormona (8). Uzlazni dio Henleove petlje nije propustan za vodu, samo za natrij klorid. To omogućava da srž postaje koncentriranija, ali postavlja i osmotski gradijent za vodu koji treba slijediti ukoliko antidiuretski hormon otvori akvaporine sabirnih kanalića (8). Bubrezi luče

eritropoetin, kalcitriol i renin (8). Eritropoetin se oslobađa kada su u krvi niske razine kisika, potiče eritropoezu crvenih krvnih stanica u koštanoj srži (8). Bubrezi su važni zbog metabolizma kalcija i fosfora, zato što aktivni oblik vitamina D kalcitriol potiče crijevnu reasorpciju kalcija i bubrežnu reasorpciju fosfata (8). Renin regulira renin-angiotenzin-aldosteron sustav (8). Bubrežni utječe i na regulaciju krvnog tlaka (9). Njegova uloga u regulaciji krvnog tlaka ponajprije ovisi o održavanju izvanstanične tekućine i koncentraciji natrija u plazmi (9). Sustav hormona renin-angiotenzin-aldosteron djeluje preko višestrukih mehanizama, a zajednička im je uloga povećana bubrežna reasorpcija natrij klorida, što dovodi do povećanja arterijskog tlaka preko povećanog volumena izvanstanične tekućine (9). Kada je renin povećan povećava se i razina angiotenzina i aldosterona, a kad su razine renina niske, razina ovih hormona se smanjuje, što uzrokuje smanjenje volumena izvanstanične tekućine i smanjenje arterijskog tlaka (9). Postoje različita patološka oboljenja bubrega, to mogu biti poremećaji u njegovoj strukturi ili funkciji (9). Nefroza je neizlječiva nefropatija, a nefritis upala bubrega (9). Neke od bolesti bubrega su: dijabetička bolest bubrega, glomerulonefritisi, intersticijski nefritis, nefrolitijaza ili bubrežni kamenci, različiti tumori bubrega, lupus nefritis, bolest minimalnih promjena, nefrotski sindrom kao skup bolesti i poremećaja, pijelonefritis, akutno i kronično zatajenje bubrega, zatim stenoza bubrežne arterije i renovaskularna hipertenzija (9). Kada dođe do završnog stadija zatajenja bubrega jedina metoda liječenja je nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom (9). Ova metoda je potrebna kad je izgubljeno 85-90 % zdrave funkcije bubrega, uz GFR između 8-10 ml/min (9). Dijaliza održava homeostazu umjesto bubrega tako što uklanja višak vode i štetnih tvari iz organizma, te regulira krvni tlak (9). Jedino izliječenje završnog stadija bubrežnog oštećenja je transplantacija bubrega (9). Osim stečenih bubreg može biti zahvaćen i nekim nasljednim bolestima kao što su: kongenitalna hidronefroza, kongenitalna opstrukcija mokraćnog sustava, dvostruki bubrezi, dvostruki ureteri, potkovasti bubrezi, policistična bolest bubrega, autosomno dominantna ili autosomno recesivna, Nutcracker sindrom, ageneza bubrega, bubrežna displazija, jednostrani mali bubreg, multicistični displastični bubreg, obstrukcija ureteropelvičnog spoja itd. (9). Prilikom dijagnosticiranja nekog patološkog stanja i bubrežne bolesti mogu nam poslužiti anamneza i klinički pregled, gdje se usmjeravamo na simptome, upale, izlaganje i konzumiranje tvarima koje mogu oštetiti bubreg, zatim obiteljska anamneza za bubrežne bolesti (10). Postoje nekoliko načina za otkrivanje bolesti bubrega (10). Prva pretraga koju radimo su testovi krvi i urina, posebice razina uree, kreatinina i elektrolita iz krvi (10). Test urina nam može ukazati na prisutnost glukoze u urinu, krvi, bjelancevina, govori nam o razini pH (10). Mikroskopska analiza može otkriti prisutnost kristala (10).

Također možemo izračunati razinu GFR (10). Slijedeći korak je ultrasonografija, a ukoliko postoje neke dileme u pretraživanju za bubrežnu bolest mogu se koristiti i CT i MRI (10). Ponekad nam ni to nije dovoljno, te je potrebno uraditi biopsiju bubrega. Kada etiologija bolesti nije jasna tu nam može pomoći bubrežna biopsija (10). Nakon što patolog pregleda preparat koji smo dobili biopsijom bubrega, zajedno sa svim dotadašnjim saznanjima, kliničkom slikom, pregledom utvrdit će se konačna dijagnoza (5). Patolog promatra uzorke na svjetlosnom mikroskopu, elektronskom mikroskopu, te uz pomoć imunofluorescentne mikroskopije (5). Uzorci se pregledavaju na svjetlosnom mikroskopu nakon više tehnika bojanja (hemalaun eozin bojanje, PAS, trikrom, srebrno bojanje) (5). Imunofluorescentne tehnike se koriste za detekciju specifičnih protutijela, bjelančevina, te depozita komplementa (5).

1.3 Šećerna bolest

Šećerna bolest je skup metaboličkih poremećaja uzrokovani povišenom razinom glukoze u krvi tijekom dužeg vremenskog razdoblja (11). Prvi simptomi koji se pojavljuju uključuju osjećaj za povećanom žeđi, učestalo mokrenje i povećanu glad (11). Šećerna bolest može dovesti do mnogih komplikacija u organizmu, osobito ukoliko se ne liječi (11). Akutne komplikacije i hitna stanja u šećernoj bolesti uključuju dijabetičku ketoacidozu, hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje i smrt (11). Ozbiljne dugotrajne komplikacije su višestruke (11). Šećerna bolest je metabolički poremećaj koji pogađa više od 300 milijuna ljudi širom svijeta (12). Zbog loših prehrambenih i životnih navika, u svijetu se brzo povećava broj oboljelih od šećerne bolesti (13). Međunarodni savez za šećernu bolest procjenjuje da će se do 2040. godine broj oboljelih od šećerne bolesti povećati na 642 milijuna (13). Šećerna bolest može biti uzrokovana nedovoljnom proizvodnjom inzulina iz gušterače ili zbog stanične rezistencije na inzulin (11). S obzirom na ove uzroke ovaj metabolički poremećaj je klasificiran u dva tipa, tip 1 (također poznat kao ovisan o inzulinu ili juvenilni oblik) i tip 2 (poznat kao neovisan o inzulinu ili adultni oblik) (14). Iako je tip 2 učestaliji, incidencija tipa 1 povećava se na globalnoj razini (14). U tipu 1 imamo nedovoljno lučenje inzulina, a u tipu 2 inzulinsku rezistenciju kada stanice ne mogu reagirati na lučenje inzulina (11). No napredovanjem bolesti i u šećernoj bolesti tipa 2 prati se nedovoljno lučenje inzulina, jer dugotrajnom hiperglikemijom dolazi do toksičnog oštećenja β stanica gušterače, što je poznato i kao toksični učinak hiperglikemije (11). Najčešći uzrok šećerne bolesti tipa 2 su loše životne navike, prekomjerna tjelesna težina, smanjena fizička aktivnost (11). Osim ova dva znamo i za gestacijski dijabetes, a javlja se kod trudnica bez prethodno poznate

prisutnosti šećerne bolesti (11). Prevencija i liječenje šećerne bolesti uključuju održavanje zdrave prehrane, redovitu tjelesnu aktivnost, normalizaciju tjelesne težine i prestanak pušenja (11). Kod bolesnika sa šećernom bolesti jako je važno održavanje krvnog tlaka (11). Kod nedostatka inzulina potrebno je nadomještanje istog inzulinskom terapijom, a u liječenju se još koriste i oralni hipoglikemici (11). U slučaju gestacijskog dijabetesa nakon rođenja djeteta bolest uglavnom nestane (11). Godine 2015. oko 415 milijuna ljudi diljem svijeta je bolovalo od šećerne bolesti, a u 90 % slučajeva radilo se o šećernoj bolesti tipa 2 (15). To predstavlja 8,3 % cijele populacije, s jednakom zastupljenošću u muškaraca i žena (15). Sve ukazuje na to da će broj oboljelih od šećerne bolesti i dalje rasti. Od 2012. do 2015. 1,5 do 5 milijuna smrtnih slučajeva u svijetu je bilo uzrokovano zbog komplikacija uzrokovanih šećernom bolesti (15). Simptomi šećerne bolesti su gubitak tjelesne težine, učestalo mokrenje, povećana žeđ i glad, te se u šećernoj bolesti tipa 1 razvijaju brzo, a u šećernoj bolesti tipa 2 puno sporije, a mogu čak i biti odsutni (16). Mogu bili prisutni i drugi simptomi koji nisu točno karakteristični za šećernu bolest, kao što su glavobolja, zamućen vid, umor, svrbež kože, sporije cijeljenje rana (16). Ukoliko hiperglikemija u krvi traje duže vrijeme može dovesti do apsorpcije glukoze u leći oka što dovodi do promjene u njenom obliku što se očituje problemima s vidom (16). Kožni osipi koji se pojavljuju u šećernoj bolesti nazivaju se dijabetički dermadromi (16). Bolesnici sa šećernom bolesti mogu imati problem i sa hipoglikemijom tj. niskom razinom glukoze u krvi (16). To se može očitovati simptomima kao što su nelagoda, znojenje, tresavica, povećan apetit do ozbiljnijih simptoma kao što su agresivnost, nesvjestica, zbunjenost, a može doći i do trajnoj oštećenja mozga i smrti ukoliko se ne prepozna na vrijeme (16). Karakteristički znakovi za hipoglikemiju su tahikardija, znojenje, blijeda i hladna koža, te se u teškim slučajevima mora provesti liječenjem injekcijama glukoze ili glukagona (17). Osim hipoglikemije koja je hitno stanje u bolesnika s šećernom bolesti, jedna od komplikacija je dijabetička ketoacidoza, metabolički poremećaj kojeg karakterizira mučnina, povraćanje, bolovi u trbuhu, miris acetona u izdahnutom zraku, duboko disanje ili takozvano Kussmaulovo disanje, te poremećaji u razini svijesti (17). Može se javiti i hiperosmolarno hiperglikemijsko stanje, ali rijeđe, te je većinom posljedica dehidracije, a češće je u šećernoj bolesti tipa 2 (17). I jedan i drugi oblik šećerne bolesti uzrokuju dugotrajne kronične komplikacije (17). Obično se razvijaju nakon nekoliko godina, no ponekad mogu biti i prvi simptom bolesti (17). Glavne dugotrajne komplikacije odnose na oštećenje krvnih žila (17). Šećerna bolest podvostručuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, a oko 75 % smrtnosti u bolesnika oboljelih od šećerne bolesti je uzrokovano arterijskom koronarnom bolesti (17). Druge komplikacije na krvnim žilama su bolest perifernih arterija i

moždani udar (17). Oštećenja koje se događaju u organizmu zbog promjena na malim krvnim žilama su oštećenja očiju, bubrega i živaca (17). Dijabetička retinopatija uzrokovana je oštećenjem malih krvnih žila u retini oka, te postupno može rezultirati gubitkom vida i sljepoćom (17). U bolesnika sa šećernom bolsti povećan je rizik od glaukoma, katarakte, te drugih bolesti oka (17). Pregled oftalmologa se preporuča jednaput godišnje za bolesnike oboljele od šećerne bolesti (17). Dijabetička bolest bubrega dovodi do oštećenja bubrežnog tkiva, proteinurije, te u konačnici vodi do kroničnog bubrežnog zatajenja i potrebe za nadomjesnim bubrežnim liječenjem dijalizom, ili transplantacijom bubrega (17). Dijabetička neuropatija posljedica je oštećenja živčanih vlakana, te bolesnici osjećaju trnce, promijenjen osjećaj boli, što može dovesti do oštećenja kože i kasnijih poteškoća u cijeljenju tkiva (17). Može se pojaviti problem sa stopalom, poznat kao dijabetičko stopalo (promjene u svodu zglobova stopala), ali i rane na nozi koje mogu zahtijevati amputacije (17). Dijabetička neuropatija uzrokuje bolnu atrofiju mišića i slabost (17). U bolesnika oboljelih od šećerne bolesti dokazan je gubitak kognitivne funkcije za 1,2 do 1,5 puta više od onih koji ne boluju od šećerne bolesti (17). U šećernoj bolesti tipa 1 ne proizvodi se inzulin u β stanicama gušterače, što može biti idiopatski ili imunološki posredovano (18). U većini slučajeva radi se o tipu šećerne bolesti koji je imunološki posredovan, u kojem autoantitijela dovode do gubitka i uništavanja β stanica (18). U Europi i SAD-u otprilike 10 % oboljelih od šećerne bolesti ima tip 1 (18). Kada bolest nastupi bolesnici većinom nemaju neke druge komorbiditete (18). U ranoj fazi bolesti javlja se dobar odgovor na terapiju inzulinom (18). Postoji i termin nestabilne šećerne bolesti kada bolesnici imaju velike promjene u razini glukoze u krvi, koje se pojavljuju bez jasnog razloga u šećernoj bolesti tipa 1 (19). No pojam nema biološke osnove i uglavnom se ne koristi (19). U šećernoj bolesti tipa 1 nerijetki su slučajevi visoke razine glukoze u krvi i dijabetičke ketoacidoze, ali i faze niske razine glukoze u krvi (19). Zbog razvijenih komplikacija bolesnici sa šećernom bolesti tipa 1 mogu biti slabije osjetljivi na nisku razinu glukoze u krvi (19). Osim toga imaju i druge komplikacije kao što su gastropareza koja dovodi do nepravilne apsorpcije dijetalnih ugljikohidrata, infekcije, te druge endokrinopatije (kao što je npr. Addisonova bolest) (19). Šećerna bolest tipa 1 povezuje se i sa genetskom predispozicijom za razvijanje bolesti, povezano s određenim HLA genima koji utječu na rizik od razvijanja šećerne bolesti (19). Kod osoba koje imaju genetsku predispoziciju za razvijanje šećerne bolesti, aktivacija bolesti je najčešće uzrokovana jednim ili više čimbenika okoliša, a može biti potaknuta i djelovanjem virusa (20). Nekoliko virusa mogu utjecati na aktivaciju bolesti, no još ne postoje čvrsti znanstveni dokazi (20). Neka istraživanja pokazuju da gliadin (bjelančevina koja je prisutna u glutenu) može imati ulogu u

razvijanju šećerne bolesti tipa 1, no još se ne zna točno kako (20). U šećernoj bolesti tipa 2 postoji inzulinska rezistencija koja je kombinirana sa relativnom smanjenom sekrecijom inzulina (20). Ovaj tip je najčešći oblik šećerne bolesti (20). U ranoj fazi bolesti smanjena je osjetljivost stanica na inzulin, te se mogu poduzeti mjere koristeći lijekove koji poboljšavaju osjetljivost na inzulin ili utječu na smanjenu proizvodnju glukoze u jetri (20). Na šećernu bolest tipa 2 utječe stil života, ali ima utjecaja i genetska predispozicija (20). Brojni čimbenici utječu na razvijanje ove bolesti, kao što su pretilost, BMI iznad 30, smanjena tjelesna aktivnost, loša prehrana i stres (20). Prekomjerna tjelesna težina je povezana s šećernom bolesti u 30 % slučajeva u Japanu i Kini, zatim 60-80 % slučajeva u Europi (20). Dijetalni čimbenici također utječu na rizik od razvijanja šećerne bolesti tipa 2 (20). Važna je količina zastupljenosti šećera u napitcima, vrsta masti u prehrani, pri čemu zasićene masnoće povećavaju rizik, a polinezasićene i mononezasićene masnoće smanjuju rizik (20). Konzumacija velikih količina bijele riže također može povećati rizik (11). Nedostatak tjelesne aktivnosti je uzrok oko 7 % slučajeva šećerne bolesti tipa 2 (11). Gestacijski dijabetes nalikuje šećernoj bolesti tipa 2, što se odnosi na nedovoljno lučenje inzulina i poremećenu osjetljivost inzulina na tkiva (11). Pojavljuje se u oko 2-10 % svih trudnoća i nakon rođenja djeteta uglavnom nestane (11). Međutim otkriveno je da nakon trudnoće 5-10 % žena ima šećernu bolest, i to u većini slučajeva šećernu bolest tipa 2 (11). Gestacijski dijabetes je potpuno izlječiv, no potreban je medicinski nadzor tijekom trudnoće (11). Trudnice moraju paziti na prehranu, mora se voditi nadzor glukoze u krvi, u nekim slučajevima je potrebna i primjena inzulina (11). Iako je prolazan, gestacijski dijabetes može i oštetiti zdravlje djeteta i majke (11). Komplikacije vezane za dijete se odnose na makrosomiju, kongenitalne abnormalnosti srca i živčanog sustava, malformacije mišićno-koštanog tkiva (11). Povećana razina inzulina u krvi djeteta može spriječiti razvijanje surfaktanta, te uzrokovati respiratorni distress sindrom (11). Velika razina bilirubina u krvi može uzrokovati razaranje crvenih krvnih stanica (11). U teškim slučajevima može doći do perinatalne smrti, uzrokovane oštećenjem vaskularnog sustava i slabe perfuzije posteljice (21). Postoji i tzv. MODY tip šećerne bolesti koji se nasljeđuje autosomno dominantno, a događa se zbog mutacije u jednom od gena koji uzrokuju nedostatak proizvodnje inzulina (21). Ime bolesti odnosi se na rane hipoteze o prirodi razvijanja iste (21). Pojavljivanje bolesti varira s dobi, te na prezentaciju bolesti utječe veličina genskog defekta i oštećenja, a postoje 13 različitih podvrsta ove bolesti (21). Bolesnici često mogu kontrolirati bolest i bez korištenja inzulina (21). Predijabetes je stanje kada su razine glukoze u krvi više od normalnih, no nisu dovoljno visoke da bi mogli reći da netko ima šećernu bolest (21). Mnogi bolesnici koji boluju od šećerne bolesti tipa 2 godinama

ranije imaju predijabetes (21). Latentni autoimuni dijabetes odraslih osoba ili LADA je stanje u kojem se šećerna bolest tipa 1 razvija u odraslih osoba (21). Bolesnici starije životne dobi tako često dobiju krivu dijagnozu šećerne bolesti tipa 2 zbog dobi, a ne gleda se uzrok (21). Postoje i oblici šećerne bolesti u kojem tkivni receptori ne reagiraju na inzulin, unatoč normalnoj razini inzulina u krvi, što ih razlikuje od šećerne bolesti tipa 2, no ovaj oblik je rijedak (21). Genetske mutacije (autosomne ili mitohondrijske) mogu dovesti do nedostatka funkcije β stanica (17). Bilo koja druga bolest koja uzrokuje oštećenje β stanica može dovesti do šećerne bolesti, kao što su cistična fibroza i kronični pankreatitis (17). Bolesti koje su povezane sa prekomjernim izlučivanjem inzulinskog antagonističkog hormona mogu dovesti do šećerne bolesti, no to se liječi uklanjanjem viška hormona (17). Mnogi lijekovi uzrokuju slabljenje izlučivanja inzulina, a neki toksini oštećuju β stanice (17). Drugi oblici šećerne bolesti uključuju kongenitalni dijabetes koji je posljedica genetskog defekta lučenja inzulina, dijabetes povezan s cističnom fibrozom, steroidnih dijabetes koji je uzrokovan primjenom visokih doza glukokortikoida, te nekoliko oblika monogenetskog dijabetesa (17). Šećerna bolest tipa 3 je predloženi termin za šećernu bolest kod Alzheimerove bolesti jer temeljni procesi mogu uključivati inzulinsku otpornost mozga (17). Inzulin je glavni hormon koji utječe na prijenos glukoze iz krvi u stanice, posebice jetru, masno tkivo i mišićno tkivo, osim glatkog mišićnog tkiva gdje inzulin djeluje preko IGF-1 (17). Stoga su nedostatak inzulina i neosjetljivost tkiva na inzulin glavne odrednice patofiziologije šećerne bolesti (18). U organizmu se glukoza stvara preko tri načina: apsorpcijom u crijevima iz hrane, razgradnjom glikogena, rezerve glukoze u jetri, te glukoneogeneza, stvaranje glukoze iz neugljikohidratnih supstanci u tijelu (18). Inzulin može spriječiti razgradnju glikogena ili zaustaviti glukoneogenezu, te potaknuti prijenos glukoze u masne i mišićne stanice, a može i potaknuti skladištenje glukoze u obliku glikogena (18). Inzulin se oslobađa iz β stanica gušterače, koje se nalaze u Langerhansovim otočićima, kada je u krvi povećana razina glukoze, obično nakon jela (18). Oko 2/3 stanica u organizmu koristi inzulin da apsorbira glukozu iz krvi, te za pretvaranje glukoze u druge molekule ili za njezinu pohranu (18). Kada u krvi imamo nisku razinu glukoze, tada se smanjuje otpuštanje inzulina iz β stanica, te se glikogen razgrađuje u glukozu (18). Ovaj proces je kontroliran glukagonom (18). Ako je količina inzulina nedostatna ili ako stanice slabije reagiraju na inzulin tada se glukoza neće apsorbirati u stanice kojima je potrebna, te se neće pravilno pohraniti u jetrenom i mišićnom tkivu (18). To rezultira povećanom razinom glukoze u krvi, slabom sintezom bjelančevina, te metaboličkom acidozom (18). Kada je razina glukoze u krvi visoka duže vrijeme, bubrezi će dosegnuti prag reapsorpcije, a glukoza će se izlučivati u urin i imamo prisutnu glikozuriju (18). To će

uzrokovati povećanje osmotskog tlaka mokraće, te spriječiti reasorpciju vode u bubrežima, što će dovesti do povećanog izlučivanja urina (poliurija), te povećani gubitak tekućine (18). Izgubljeni volumen tekućine tijelo pokušava nadomjestiti vodom iz drugih stanica i dijelova organizma, što će rezultirati dehidracijom i polidipsijom (povećanim unosom vode) (18). Šećerna bolest se dijagnosticira kada je razina glukoze u plazmi ≥ 7 mmol/l natašte, ili ≥ 11.1 mmol/l nakon OGTT testa, a HbA1c ≥ 6.5 % (18). Ukoliko je jedan od rezultata pozitivan, mjerenje treba ponoviti uz pomoć bilo kojeg testa slijedeći dan (18). Najbolje se smatra test mjerenja glukoze natašte, te dva mjerenja natašte u kojima je razina glukoze u plazmi iznad 7 mmol/l se smatraju šećernom bolesti (18). Smatra se da osobe koje natašte imaju razinu glukoze između 6.1 do 6.9 mmol/l imaju manjak glukoze u gladovanju (18). Kada gledamo rizik od razvijanja kroničnih komplikacija šećerne bolesti najbolja metoda mjerenja je glikirani hemoglobin (18). Ne postoji poznata mjera prevencije za razvijanje šećerne bolesti tipa 1, no za šećernu bolest tipa 2 koja čini 85-90 % slučajeva imamo nekoliko mjera u prevenciji bolesti (15). Bolest se može spriječiti ili odgoditi održavanjem normalne tjelesne težine, bavljenjem fizičkom aktivnošću, te konzumacijom zdrave hrane (15). Viša razina tjelesne aktivnosti (više od 90 minuta dnevno) smanjuje rizik za razvijanje šećerne bolesti za 28 % (15). Prehrana bogata vlaknima i žitaricama, polinezasićenom masti, biljna ulja i riba su djelotvorne u sprječavanju razvijanja šećerne bolesti (15). Izbjegavanje konzumiranja zasićenih masti, slatkih napitaka, te crvenog mesa je također jedna od mjera (15). Prestanak pušenja je preventivna mjera, s obzirom da pušenje uzrokuje komplikacije i može ubrzati razvijanje šećerne bolesti (15). Cilj u šećernoj bolesti je postizanje razine glikiranog hemoglobulina od 6.5 %, ali ne bi trebala biti niža od toga (11). Također treba smanjiti ostale čimbenike rizika kao što su: pušenje, hiperkolesterolemija, pretilost, povećan krvni tlak, te redovita tjelovježba (11). Kronična hiperglikemija može oštetiti razne organe i uzrokovati ozbiljne komplikacije (13). Upravo je zbog toga jako bitno postizanje i održavanje čvrste kontrole glikemije, a posebno radi sprječavanja razvoja i napredovanja kronične bubrežne bolesti (22). Istraživanja pokazuju da provjerena kontrola glikemije u šećernoj bolesti tipa 1 i 2 može smanjiti rizik od razvoja dijabetičke bolesti bubrega (23). Kontrola glikemije se smatra ključnim korakom za usporavanje napredovanja dijabetičke bolesti bubrega, kao i ostalih mikrovaskularnih komplikacija (22). Bubrežna oštećenja koja se razvijaju u najranijem stadiju šećerne bolesti mogu se usporiti strogom kontrolom glikemije (23). Također, liječenje inzulinom smanjuje progresiju oštećenja glomerula u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 i mikroalbuminurijom (23). Dugotrajne komplikacije šećerne bolesti tipa 1 uključuju neuropatiju, retinopatiju, kataraktu, bolesti kardiovaskularnog sustava, te dijabetičku bolest

bubrega (24, 25). Navedene komplikacije pojavljuju se i kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2, zajedno sa ulceracijama, amputacijama, infekcijama, probavnim smetnjama, komplikacijama usne šupljine i depresijom (26). Prisutnost retinopatije nam ukazuje na to da je šećerna bolest prisutna već 10 godina (22). Jedna od glavnih kroničnih komplikacija šećerne bolesti tipa 1 i 2 je dijabetička bolest bubrega, koja je najčešći uzrok kronične bubrežne bolesti koja vodi u završni stadij bubrežnog oštećenja i prerane smrti u razvijenim zemljama (27). Dijabetička bolest bubrega je najviše povezana sa disfunkcijom glomerula (28). Glavne karakteristike dijabetičke bolesti bubrega uključuju zadebljanje glomerularne bazalne membrane, ekspanziju mezangija, skraćivanje, stanjivanje i odstranjivanje podocita, fenestrirano područje endotelne stanice je smanjeno, oslabljen je glikokaliks, te je poremećena komunikacija između endotelne i susjedne stanice glomerula (29). Najranija promjena koja se događa u bubrezima kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 je hipertrofija bubrega (23). Nakon nekoliko godina prisutnosti šećerne bolesti mogu se pojaviti oštećenja glomerula, u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 (23). Isto se događa prilikom transplantacije zdravog bubrega bolesniku koji ima šećernu bolest (23). Zadebljanje glomerularne bazalne membrane je prvi put zabilježeno nakon 1.5 do 2.5 godine trajanja šećerne bolesti tipa 1 (23). U mnogih bolesnika glomeruli ostaju neoštećeni i desetljećima nakon početka šećerne bolesti, dok drugi razviju progresivnu ekspanziju mezangija (23). Znak nodularne ekspanzije mezangija su Kimmelstiel-Wilsonovi čvorići, koji se nalaze u 40-50 % bolesnika sa šećernom bolesti (23). Otprilike pola bolesnika sa ozbiljnim oštećenjem bubrežne funkcije u šećernoj bolesti nemaju ovakve promjene (23). Hijalinoza arteriole koja zamjenjuje glatke mišićne stanice aferentne i eferentne arteriole je također znak ranog oštećenja bubrega (23). Ova oštećenja su povezana s razvijanjem glomeruloskleroze, kao rezultat glomerularne ishemije (23). Na oštećenja bubrega u šećernoj bolesti utječu trajanje šećerne bolesti, kontrola glikemije, te genetski čimbenici (23). Ne možemo sa sigurnošću reći nakon koliko vremena će se razviti glomerularno oštećenje, kod nekih bolesnika to bude nakon 15 godina, kod nekih se desetljećima ne događaju nikakve promjene (23). Osim glomerularnog oštećenja u dijabetičkoj bolesti bubrega imamo i tubulointesticijsko oštećenje, vidi se zadebljanje glomerularne i tubularne bazalne membrane (23). Tako se mogu naći i tubularna hipertrofija, epitelnog mezenhimalnog tranzicija, akumulacija glikogena, te upala intersticija (23). Disfunkcija glikokaliksa se najviše spominje kao mogući uzrok i glomerulopatije i tubulopatije (23). Glikokaliks prekriva luminalnu površinu endotela, te tako regulira funkciju endotela krvne žile djelujući kao filtracijska barijera (23). Nakupljanje izvanstaničnog matriksa je povezano s zadebljanjem bazalne membrane, te tubularnom hipertrofijom (23). To

dovodi do poremećaja u odnosu sinteze i razgradnje izvanstaničnog matriksa, te se događa ekspanzija mezangija (23). Ne zna se točno zašto hiperglikemija uzrokuje nakupljanje izvanstaničnog matriksa (23). Neka istraživanja to povezuju s povećanom razinom TGF- β , protein kinazom C, koji pokreću nakupljanje aktivacijom cikličkog adenozin monofosfata (cAMP), te tako povećava razinu završnih produkata glikemije (23). S dijabetičkom bolesti bubrega se povezuje i oksidativni stres (23). Glavni cilj u promatranju liječnika i znanstvenika je još uvijek oštećenje glomerula, no moguće je da je oštećenje tubula povezano više sa poremećajem bubrežne funkcije nego oštećenje glomerula (23). Kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 tubularna proteinurija se događa ranije od proteinurije glomerula, što može značiti i ranije oštećenje tubula (23). Promjene u mezangiju, glomerularnoj i tubularnoj bazalnoj membrane predstavljaju ekspanziju izvanstaničnog matriksa, te njegovih komponenti kao što su kolagen tipa IV i VI, laminin i fibronektin (23). To sve skupa dovodi do povećanog nakupljanja intersticijskog fibrilarnog kolagena i gubitka peritubularnih kapilara (23). Kronična bolest bubrega do koje dovodi dugotrajna šećerna bolest, sastoji se od skupine progresivnih stanja koje su karakterizirane poremećenom bubrežnom funkcijom, što s vremenom vodi u završnu fazu bubrežne bolesti i preranu smrt (22). Stopa smrtnosti u bolesnika sa dijabetičkom bolesti bubrega je visoka, a kao glavni razlog se navode kardiovaskularne komplikacije (23). Oštećenje bubrega kod šećerne bolesti se može odgoditi, no ne i spriječiti u mnogim slučajevima, unatoč upotrebi terapije antihipertenzivima i kontrole glikemije (23). U Sjedinjenim Američkim Državama pola bolesnika koji započinju nadomještanje bubrežne funkcije dijaliznim liječenjem imaju šećernu bolest (23). Istraživanje je pokazalo da kod bolesnika sa uspješnom trasplantacijom gušterače, te dobrom kontrolom glikemije imamo čak i oporavak bubrežne funkcije u glomerulima, u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 (23). Ključni proces za razvijanje bubrežnih promjena je hiperglikemija, s obzirom da korekcija hiperglikemije pokazuje pozitivne ishode na bubrežno tkivo, te popravljjanje bubrežne ozljede (23). Osim hiperglikemije, u dijabetičkoj bolesti bubrega imamo hiperfiltraciju koja oštećuje bubreg (aktivacija renin-angiotenzin-aldosteron sustava) (23). Bolesnici sa hiperfiltracijom uzrokovanom nekim drugim razlogom ne razvijaju oštećenje bubrega (23). Bez obzira na to hiperfiltracija nam nije dostatan razlog da bi objasnili rana oštećenja u dijabetičkoj bolesti bubrega (23). Hiperfiltracija je povezana s ubrzanom GFR, što rezultira njenim smanjenjem (23). Angiotenzin II uzrokuje porast unutarglomerularnog tlaka i hiperfiltraciju (23). Osim toga, povećava razinu medijatora upale i ozljede, kao što je protein kinaza C (23). Povećan tlak u glomerulu uzrokuje lučenje proupalnih faktora (23). S obzirom na oštećenje bubrežne funkcije razlikujemo pet stadija

kronične bubrežne bolesti, stadiji 1 i 2 u kojima imamo albuminuriju sa normalnom ili srednjom poremećenom vrijednosti EGFR, zatim stadij 3-5 s postupnim snižavanjem vrijednosti EGFR, te ukoliko bolesnik ima smanjenu EGFR i/ili povećanu albuminuriju potrebno ga je uputiti nefrologu (22).

Dijabetička bolest bubrega postala je glavni uzrok kronične bubrežne bolesti i završnog stadija bubrežnog oštećenja, i smatra se da će se učestalost bolesti još više povećati proporcionalno s učestalošću šećerne bolesti (22). Gubitak bjelančevina u dijabetičkoj bolesti bubrega može biti masivan, te hipoalbuminemija dovodi do stvaranja edema i do nefrotskog sindroma (30). Smatra se da se značajna albuminurija razvije tek nakon 7 godina prisutnosti šećerne bolesti (22). Ukoliko se dijagnosticira ranije od predviđenog, vjerojatno je da je šećerna bolest bila prisutna prije nego što se uspjelo dijagnosticirati i otkriti, ili da je proteinurija uzrokovana iz nekih drugih razloga (22). Bitna je rana prevencija bolesti, što se danas kontrolira preko mjerenja albuminurije, te procijenjenom brzinom glomerularne filtracije (EGFR) (22). Kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 koji imaju smanjenu EGFR, a normoalbuminuriju, imamo veća oštećenja glomerula, te imaju povećani rizik za progresiju bolesti (23). EGFR se izračunava iz serumskog kreatinina preko validirane formule, a patološki nalaz je definiran kao $EGFR \leq 90 \text{ ml/min/1.73m}^2$ kad imamo blagi do umjereni gubitak funkcije bubrega, a ukoliko su vrijednosti $EGFR \leq 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ radi se o većem gubitku funkcije bubrega (22). Novije formule za EGFR mogu uključivati i mjere serumskog cistatina C, što je povezano sa boljom prediktivnom točnošću za povećan rizik razvijanja završnog stadija bubrežne bolesti (22). Za dijagnozu bolesti i za praćenje su bitni albuminurija i mjerenje EGFR, te se svaka od ovih vrijednosti mijenja tijekom vremena (22). Kod nekih bolesnika ne moramo imati povišene vrijednosti UACR, unatoč niskim vrijednostima EGFR, što može biti uzorkovano lažnom albuminurijom zbog upotrebe inhibitora renin angiotenzin aldosteron sustava, ali može se dogoditi i spontano (22). Normoalbuminurija definirana je kao razina izlučivanja albumina iz urina (UAER) manje od $20 \mu\text{g/min}$, odnosno omjer albumina/kreatinina u urinu (UACR) manji od 30 mg/g (23). Mikroalbuminurija (umjereno povećana albuminurija) rani je pokazatelj oštećenja bubrega i najčešće se mjeri kao omjer albumina/kreatinin u urinu (UACR), a definirana je kada imamo patološki nalaz $UACR \geq 30 \text{ mg/g}$ (22). Makroalbuminurija (izrazito povećana albuminurija) definirana je kada je UACR od 300 mg/g ili više (22). Novi nazivi za navedene termine su umjereno povećana albuminurija, te značajno povećana albuminurija (23). U novijim istaživanjima se navodi i mogućnost postojanja bolesnika sa dijabetičkom bolesti bubrega bez prisutnosti albuminurije i proteinurije, takozvana progresivna dijabetička bolest bubrega (22). Mnogi mehanizmi koji

dovode do bubrežnog oštećenja u šećernoj bolesti su nepoznati, te se još istražuju. U istraživanjima se navodi genetska predispozicija za razvijanje oba tipa šećerne bolesti (23). Bolesnici sa šećernom bolesti koji imaju povećani rizik za razvijanje dijabetičke bolesti bubrega imaju i povećani rizik za razvijanje glomerulopatije, neovisno o vrijednostima glikemije (23). Novi genski lokusi povezani s albuminurijom su otkriveni u studiji GWAS, meta-analize albuminurije u normalnoj populaciji (23). Pokazali su povezanost između gena koji kodira bjelančevinu kubilin (CUBN) i albuminurije (23). Bolesnici sa šećernom bolesti tipa 1 imaju povećani rizik i za druge autoimune bolesti, kao npr. Addisonova bolest, celijakija, Gravesova bolest, hipotireoidizam i anemija (31). U literaturi se šećerna bolest navodi kao jedan od rizičnih čimbenika za razvoj nekoliko vrsta karcinoma, kao što su karcinom gušterače, jetre, debelog crijeva, dojki, mokraćnog sustava i maternice (32). Hiperinzulinemija i inzulinska rezistencija koje su karakteristične za šećernu bolest tipa 2 su često povezane s karcinomima (33, 34). Međutim, nedostatak inzulina, kao što je slučaj u šećernoj bolesti tipa 1, je također povezan sa razvojem karcinoma, te bolesnici sa šećernom bolesti tipa 1 imaju veći rizik za različite vrste karcinoma od bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 (33-36). Različita istraživanja su pokazala povećanu učestalost karcinoma u bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 (karcinom želuca, jetre, gušterače, kože i maternice) (34-36). Međutim, dodatne studije su pokazale da nema povećane smrtnosti od karcinoma među bolesnicima koji imaju šećernu bolest tipa 1 (37). Osim toga, nalaze se proturječni dokazi da šećerna bolest tipa 1 doprinosi povećanom riziku za razvoj karcinoma bubrega (34, 36). Dijabetička bolest bubrega više pogađa bolesnike sa šećernom bolesti tipa 1 od tipa 2, što rezultira završnim stadijem bubrežnog oštećenja, i razvoju karcinoma bubrežnih stanica (38-40). Žene i muškarci sa šećernom bolesti imaju veći rizik za razvoj karcinoma bubrežnih stanica za 50%, s obzirom na trajanje bolesti i postojanje drugih rizičnih čimbenika, kao što su pretilost i povišeni krvni tlak (38). U liječenju šećerne bolesti mogu se koristiti inzulin, bigvanidi, sulfonilureja, meglitinidi, te tiazolidindioni (22). Neki od lijekova su dostupni za peroralnu primjenu kao što je metformin koji spada u skupinu bigvanida, a neki su dostupni u injekcijama kao što su GLP-1 agonisti (11). U šećernoj bolesti tipa 1 za liječenje se primjenjuje inzulin, a u terapiji šećerne bolesti tipa 2 u prvom redu se preporučuje metformin jer dokazano smanjuje smrtnost (11). Djeluje tako da smanjuje proizvodnju glukoze u jetri (11). Svi lijekovi različito djeluju, neki tako što povećavaju otpuštanje inzulina, neki smanjuju apsorpciju šećera iz crijeva, a neki utječu na jaču osjetljivost tkiva i stanica na inzulin (11). Ukoliko i u šećernoj bolesti tipa 2 uvodimo terapiju inzulinom obično se i nastavljaju primijenivati peroralni lijekovi uz kombinacije dugodjelujućih inzulina (11). S obzirom da je

različito djelovanje lijekova moraju se primijenjivati s oprezom u bolesnika sa oštećenjem bubrežne funkcije (22). Najdjelotvornija terapija za snižavanja glukoze u krvi je inzulin (22). Inzulin utječe i na povećavanje iskorištavanja glukoze, te smanjenje glukoneogeneze (41). Prije je terapija inzulinom bila rezervirana za one koji nisu postizali dobru kontrolu glikemije primjenom oralnih hipoglikemika, međutim danas se primjena povećava, zahvaljujući i dokazima da terapija inzulinom u ranijim stadijima šećerne bolesti može povećati kontrolu glikemije i očuvati sposobnost gušterače da luči inzulin (22). Bolesnici sa oštećenjem bubrežne funkcije trebaju s oprezom primijenjivati inzulin, s obzirom na inzulinsku rezistenciju i usporeno izlučivanje inzulina zbog opasnosti od hipoglikemije, ovisno o tome koji inzulin se primijenjuje (22). Kod njih je potrebna redukcija doze ili ponekad čak i prekid liječenja (22). Za bolesnika se šećernom bolesti se preporučuje i stroga kontrola krvnog tlaka, budući da su glavni uzrok smrtnosti kardiovaskularne komplikacije (11). Tako se dijabetičarima preporučava razina krvnog tlaka od 130/80 mmHg (11). Međutim neka istaživanja navode više vrijednosti kao što su 140/90 do 160/100 mmHg, a jedina prednost niže razine je bila smanjenje rizika od moždanog udara (42). Učinkovita mjera je i gubitak tjelesne težine, te smanjenje BMI-a (21). U bolesnika oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 razmatra se i transplantacija gušterače kao jedan od mogućih načina izliječenja, ukoliko to uključuje teške kronične komplikacije šećerne bolesti uključujući završni stadij zatajenja bubrežne funkcije i potrebnu transplantaciju bubrega (21).

I danas se intenzivno istražuje o patofiziološkim mehanizmima bubrežne ozljede u šećernoj bolesti, te rizičnim faktorima za dijabetičku bolest bubrega (23). Specifični čimbenici i biljezi mogu se koristiti za proučavanje razvojnih putova i promjena u dijabetičkim bubrezima štakora. U ovom istraživanju koriste se dva biljega, SATB1 i PTEN.

1.4 SATB1

SATB1 je lokaliziran na genomu 3p24.3, kodira bjelančevinu matriksa koja veže nuklearni matriks i DNK u jedinstvenu nuklearnu strukturu (43). SATB1, tkivno specifična jezgrina matriks vezujuća bjelančevina, odgovoran je za regulaciju strukture kromatina i izražaj tkivnih specifičnih antigena, te uglavnom nije izražen u zdravim tkivima (44, 45). Izražen je u T stanicama, gdje ima važnu ulogu u njihovom razvoju, diferencijaciji crvenih krvnih stanica, staničnoj homeostazi i odgovoru na razne podražaje (45, 46). Istraživanja su pokazala da je SATB1 povećano izražen u stanicama različitih vrsta karcinoma (47, 48), te se njegov izražaj postupno povećava s rastom tumora, što je od presudne važnosti za preživljavanje tumora i metastaze (49, 50). Mao i ostali su pokazali da je izražaj SATB1

prisutan kod progresije i metastaza karcinoma prostate (48). Druge studije su pokazale prekomjerni izražaj SATB1 u stanicama kolorektalnog karcinoma gdje potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) preko Wnt/ β -katenin puta, te utječe na diferencijaciju, invaziju i metastaziranje karcinoma (51). Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) je bitan proces u razvojnog putu, gdje epitelne stanice poprimaju mezenhimalne, fibroblastima slične karakteristike i pokazuju smanjenu međustaničnu povezanost i povećavanu smrtnost (52). Prema tome, EMT igra bitnu ulogu u ranoj invaziji i metastaziranju stanica karcinoma (53, 54). Istraživanja su pokazala da povećan izražaj SATB1 može preko EMT biti pokazatelj napredovanja agresivnog fenotipa karcinoma bubrežnih stanica, njegove invazije i metastaziranja (54). Osim u T stanicama prisutan je i u drugim tkivima, ali u veoma maloj količini, kao što su mozak, limfno tkivo, slijepo crijevo, koštana srž, pluća, prostata, slezena, štitnjača, bubreg, mokraćni mjehur itd. (43). SATB1 do sada nije bio istraživani u stanicama dijabetičkih bubrega.

1.5 PTEN

PTEN je gen koji kodira bjelančevine, a nalazi se na genomu 10q23.31 (55). PTEN bjelančevine primarno su smještene i funkcionalne u jezgri (55). Bjelančevina koja je kodirana ovim genomom je fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfataza 3-fosfataza (55). Sadrži domenu tenzin, te katalitičku domenu sličnu onoj s proteinskih tirozinskim fosfatazama dvojne specifičnosti (55). Ovaj enzim defosforilira fosfoinozidne supstrate, za razliku od ostalih većine proteinskih tirozinskih fosfataza (56). Ima ga u mnogim tkivima kao što su slijepo crijevo, nadbubrežna žlijezda, koštana srž, masno tkivo, mozak, debelo crijevo, dvanaesnik, maternica, slezena, mokraćni mjehur, bubreg, prostata (56). PTEN je glavna komponenta signalnog puta PI3/kinaze/bjelančevinske kinaze B (AKT) u kojem je njegova uloga ograničavanje aktivnosti istog (57-59). Suzbijanjem aktivnosti PI3/AKT puta, PTEN djeluje kao tumor supresor (58). PTEN također igra ulogu u različitim staničnim procesima, kao što su preživljavanje, proliferacija, energetski metabolizam, održavanje stanične strukture, te inhibiranje stanične migracije (59, 60). Poznato je i da započinje apoptotičke putove, te zaustavlja stanični ciklus (61). Signalni put PI3/kinaza/bjelančevinska kinaza B promične preživljavanje i rast kao odgovor na neke izvanstanične podražaje, a glavne komponente puta su fosfatidilinozitol 3 kinaza i Akt (protein kinaza B) (62). Aktivirana fosfatidilinozitol 3 kinaza fosforilira lipide na membrani, formirajući oblik fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfatazu (62). Akt, serin/treonin kinaza veže se na membranu preko interakcije s fosfoinozitidima tako

da se može potpuno aktivirati (63). Aktivirani Akt uzrokuje nekoliko odgovora i reakcija kao što su preživljavanje stanice, rast, proliferacija, migracija stanica, angiogeneza, a sve to radi tako što fosforilira veliku količinu unutarstaničnih bjelančevina (64). Akt fosforilira čak 100 različitih supstanci, što dovodi do širokog raspona učinka na stanice (65). Ovaj put je prisutan u svim višim stanicama eukariota (64). Često je u interakciji sa drugim putevima, te je reguliran višestrukim mehanizmima (64). Ukoliko nema kontrole regulacije ovog puta dolazi do povećanja aktivnosti signala, što je slučaj kod nekih karcinoma, a isto je dokazano i u šećernoj bolesti (65). Glavni antagonist ovog puta je PTEN, koji je u karcinomima mutiran (65). PTEN negativno regulira unutarstanične razine fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfata i djeluje kao tumor supresor negativno regulirajući signalni put AKT/PKB (62). Korištenje nekanonskih (CUG) uzlaznih početnih mjesta proizvodi dulju izoformu koja pokreće prevođenje s leucinom i za koju se smatra da je povezana s mitohondrijskom unutarnjom membranom (63). Ova dulja izoforma može pomoći u regulaciji metabolizma energije u mitohondrijima (63). Pseudogen ovog gena nalazi se na kromosomu 9 (63). Alternativno spajanje i upotreba multiplih translacija početnih kodona rezultira višestrukim varijantama transkripta koji kodiraju različite izoforme (63). Smanjen izražaj PTEN-a je zabilježen u mezangijskim stanicama i podocitima dijabetičkih miševa, kao i kod bolesnika sa dijabetičkom bolesti bubrega (66). Isto je zabilježeno u bubrežnim tubularnim epitelnim stanicama kod dijabetičkih štakora, gdje je bila prisutna prevelika aktivacija PI3K-PKB/Akt puta pomoću TGF- β 1 koji pomaže u inicijaciji i progresiji dijabetičke bolesti bubrega (67). Gubitak izražaja PTEN-a u ozljedi bubrega započinje SMAD3- i p53-ovisni odgovor fibroze (68). Disregulacija tumor supresora PTEN-a se događa kod fibroze kože i pluća, te ishemičke ozljede bubrega (68). PTEN regulira bubrežni izvanstanični matriks u šećernoj bolesti, te u usporedbi sa normalnim miševima, dijabetički miševi pokazuju smanjen izražaj PTEN-a (69). Imunohistokemija i PCR analize su pokazale da su mutacije, te smanjen izražaj gena za PTEN povezani s progresijom karcinoma mokraćnog mjehura kod ljudi (70). S obzirom da gen za PTEN ima važnu ulogu u inhibiciji rasta karcinoma bubrežnih stanica, njegova regulacija, koja je povezana sa šećernom bolesti tipa 1 i posljedičnom dijabetičkom bolesti bubrega, također može pridonijeti invaziji karcinoma i metastaziranju (66, 67). U dosadašnjim istraživanjima dijabetička bolest bubrega je povezana sa smanjenim izražajem PTEN-a, što može voditi u malignu transformaciju bubrežnog tkiva.

Prema našim saznanjima, do sada nije objavljena studija koja istražuje izražaj ova dva biljega zajedno u bubrezima dijabetičkih štakora tijekom starenja.

2. CILJ RADA I HIPOTEZA

Cilj ovog rada jest primjenom imunohistokemijskih biljega SATB1 i PTEN-a usporediti izražaj navedenih čimbenika u stanicama glomerula, proksimalnog i distalnog tubula u normalnom tkivu bubrega štakora i u tkivu bubrega štakora koji imaju šećernu bolest tipa 1 u različitim vremenskim razdobljima (2 tjedna, 6 mjeseci i 12 mjeseci). Ranije studije o dijabetičkoj bolesti bubrega se nisu bavile istraživanjem izražaja biljega SATB1 u dijabetičkim bubrezima štakora, kao ni oba biljega zajedno. S obzirom da je dosta toga o navedenoj problematici neistraženo, te se svakim danom upoznajemo s novim saznanjima, smatram da je svako novo istraživanje jako važno, te nam može ukazati na novi cilj u liječenju ove bolesti.

Sporedni ciljevi istraživanja:

a) Primjenom dvostrukog bojanja (imunofluorescencije) istražiti prostornu i vremensku raspodjelu pojavljivanja biljega SATB1 i PTEN, te jačinu njihovog izražaja u normalnom tkivu bubrega, te u tkivu bubrega koji je izmijenjen zbog utjecaja šećerne bolesti tipa 1.

b) Primjenom dvostrukog bojanja (imunofluorescencije) usporediti raspodjelu pojavljivanja biljega:

- SATB1 i PTEN u normalnom tkivu bubrega u različitim vremenskim razdobljima (nakon 2 tjedna, 6 mjeseci i 12 mjeseci), te u tkivu bubrega koji je izmijenjen zbog utjecaja šećerne bolesti tipa 1.

- SATB1 i PTEN između normalnog tkiva bubrega i tkiva bubrega izmijenjenog zbog utjecaja šećerne bolesti tipa 1, ali unutar istog vremenskog razdoblja.

- SATB1 i PTEN u različitim dijelovima bubrega (glomerul, proksimalni i distalni tubul) između normalnog tkiva i tkiva bubrega izmijenjenog zbog utjecaja šećerne bolesti tipa 1 u istom vremenskom razdoblju.

- SATB1 i PTEN među istim skupinama što znači u istom vremenskom razdoblju i u istom tkivu bubrega.

Očekuje se dokazati kako je povećan izražaj biljega SATB1, a smanjen izražaj PTEN-a, u stanicama bubrega štakora koje su promijenjene zbog utjecaja šećerne bolesti, s obzirom na vremensko razdoblje od 2 tjedna, 6 mjeseci i 12 mjeseci i dosadašnja saznanja i istraživanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Etika

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je započeto 2010. godine u okviru znanstveno istraživačkog projekta kojeg je financirala Hrvatska zaklada za znanost. Doktorska disertacija je financirana projektom Hrvatske zaklade za znanost: Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta (CAKUT) tijekom razvoja u miša i čovjeka IP-06-2016-2527, te je sufinancirana sredstvima iz Programa tehnološkog razvoja, istraživanja i primjene inovacija Splitsko-dalmatinske županije pod naslovom: “Jačanje kapaciteta za razvoj istraživanja i dijagnostike bolesti bubrega”.

3.2 Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na pokusnim Sprague-Dawley štakorima, mužjacima, koji su težili između 160 i 180 g, uzgajani u nastambi za životinje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod kontroliranim uvjetima koji su uključivali temperaturu od $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ i raspored od 12 h svjetla 12 h mraka.

3.3 Indukcija i validacija šećerne bolesti

Istraživanje je provedeno na modelu štakora sa šećernom bolesti tipa 1 koja je bila inducirana intraperitonealnom injekcijom 55 mg/kg streptozotocina (STZ) svježe otopljenog u citratnom puferu preko noći, pH od 4.5. Kontrolni štakori dobili su intraperitonealno samo injekciju citratnog pufera. Štakori su hranjeni normalnom laboratorijskom hranom koja je sadržavala 64% ugljikohidrata, 27% bjelančevina i 9% masti.

Razina glukoze u plazmi i tjelesna težina bili su korišteni kao validacija indukcije šećerne bolesti. One Touch Vita instrument koristio se za mjerenje glukoze u plazmi preko krvi iz vene u repu štakora. Štakori koji su imali razinu glukoze u krvi iznad 16.5 mmol/l bili su smatrani dijabetičarima. Za mjerenje tjelesne težine korištena je ljestvica. Dijabetički štakori su podijeljeni u 3 skupine, ovisno o trajanju šećerne bolesti- 2 tjedna, 6 i 12 mjeseci (DM-2t, DM-6m, DM-12m). Za svaku dijabetičku skupinu imali smo i kontrolnu, u jednakom vremenskom periodu (C-2t, C-6m, C-12m). U svakoj dijabetičkoj i kontrolnoj skupini bilo je 6 životinja.

3.4 Sakupljanje tkiva i imunohistokemija

Štakori su anestezirani uz pomoć izoflurana. Nakon toga su perfuzirani s 300 ml Zambonijevog fiksativa (4% paraformaldehida i 15% pikrinske kiseline u 0,1M fosfatno puferiranoj slanoj otopini), neposredno nakon ispiranja fiziološkom otopinom pri pH 7.4. Od svakog štakora smo odvojili dijelove sa bubregom i pripadajućim masnim tkivom za daljnju analizu, te su bili post-fiksirani u istom fiksativu. Na bubrežima su napravljeni poprečni rezovi, te je tkivo bilo ugrađeno u parafinske blokove i izrezano na rezove debljine 7 μ m. Nakon deparafinizacije dijelovi tkiva su bili rehidrirani u vodi i alkoholu. Nakon toga smo ih kratko isprali destiliranom vodom, te grijali u natrij citratnom puferu (pH 6.0) pri 95°C kroz 12 minuta u mikrovalnoj pećnici. Nakon hlađenja do sobne temperature dijelovi tkiva su bili inkubirani sa primarnim protutijelima.

Kozji antiserum SATB1 (SC-5930, Santa Cruz, California, USA) razrijeđen je 1:200 i mišji antiserum PTEN (MAB847, Minneapolis, USA) 1:100 u DAKO otopini za razrjeđivanje protutijela. Rezovi su bili prekriveni otopinom primarnih protutijela i ostavljeni preko noći u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja rezova s PBS-om, slijedila je inkubacija rezova s kombinacijom sekundarnih protutijela: Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150129) i Goat Anti-Mouse IgG H&L (TRITC) (ab6786) kroz jedan sat u vlažnoj komori.

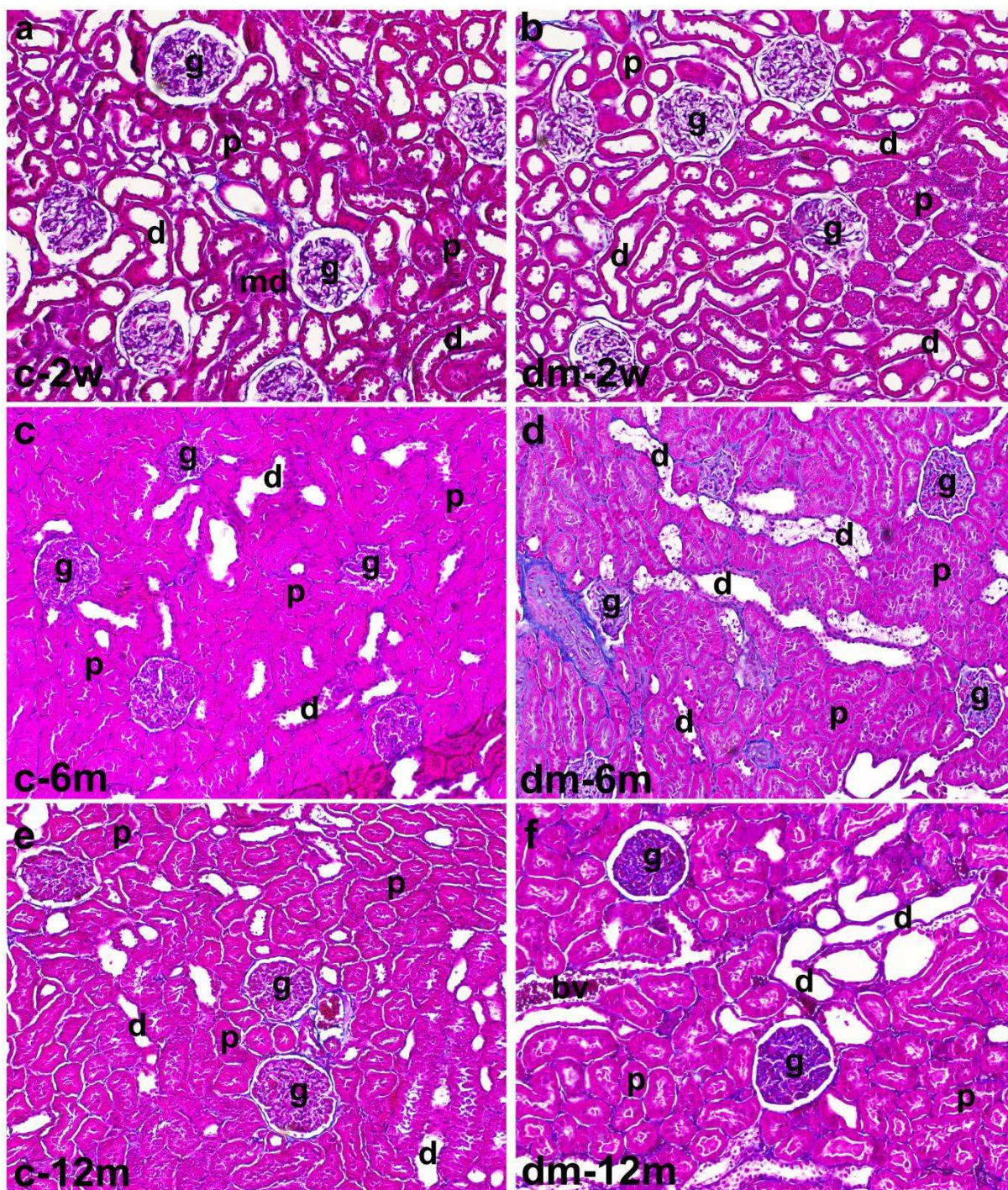
Rezovi su isprani s PBS-om, zatim obojani s DAPI-jem. DAPI bojanje se upotrebljava u različitim fluorescentnim tehnikama i prikazuje specifično jezgru. Obojani dijelovi tkiva bubrega su pregledani i fotografirani uz pomoć BX51 mikroskopa (Olympus, Tokio, Japan) i obrađeni pomoću Cella vizualizirajućeg Softwarea.

Za tkiva bubrega određena su tri područja od interesa u kojem smo prebrojavali stanice, a u skladu s njihovim morfološkim izgledom: glomerul, proksimalni (PT) i distalni tubuli (DT) (Slika 1). U svakom od navedenih područja rezovi su bili snimani na povećanju od $\times 40$ kako bi se prikupilo 10 nepreklapajućih polja za daljnju analizu. Svako polje je jedna slika. Mikroskopske fotografije su bile analizirane uz pomoć programa ImageJ software pomoću kojeg smo podijelili sva područja na slikama na kvadrate od 20 μ m $\times$ 20 μ m pri $\times 40$ uvećanju, gdje smo brojali udio pozitivnih stanica ovisno o prisutnosti intenziteta boje u određenom području koje je gledano (zelena boja za SATB1 i crvena za PTEN) (Slika 2). Ukratko, samo kvadrati koji potpuno pokrivaju područje od interesa su bili izbrojeni. Kako bi se izbjeglo brojanje iste stanice dva puta, svaki drugi uzastopni rez se koristio i stanice ispod lijevog i gornjeg ruba svakog kvadrata nisu bile uzete u obzir, samo one na desnoj i donjoj granici. Broj pozitivnih stanica bio je izračunat na šest reprezentativnih polja iz svake slike.

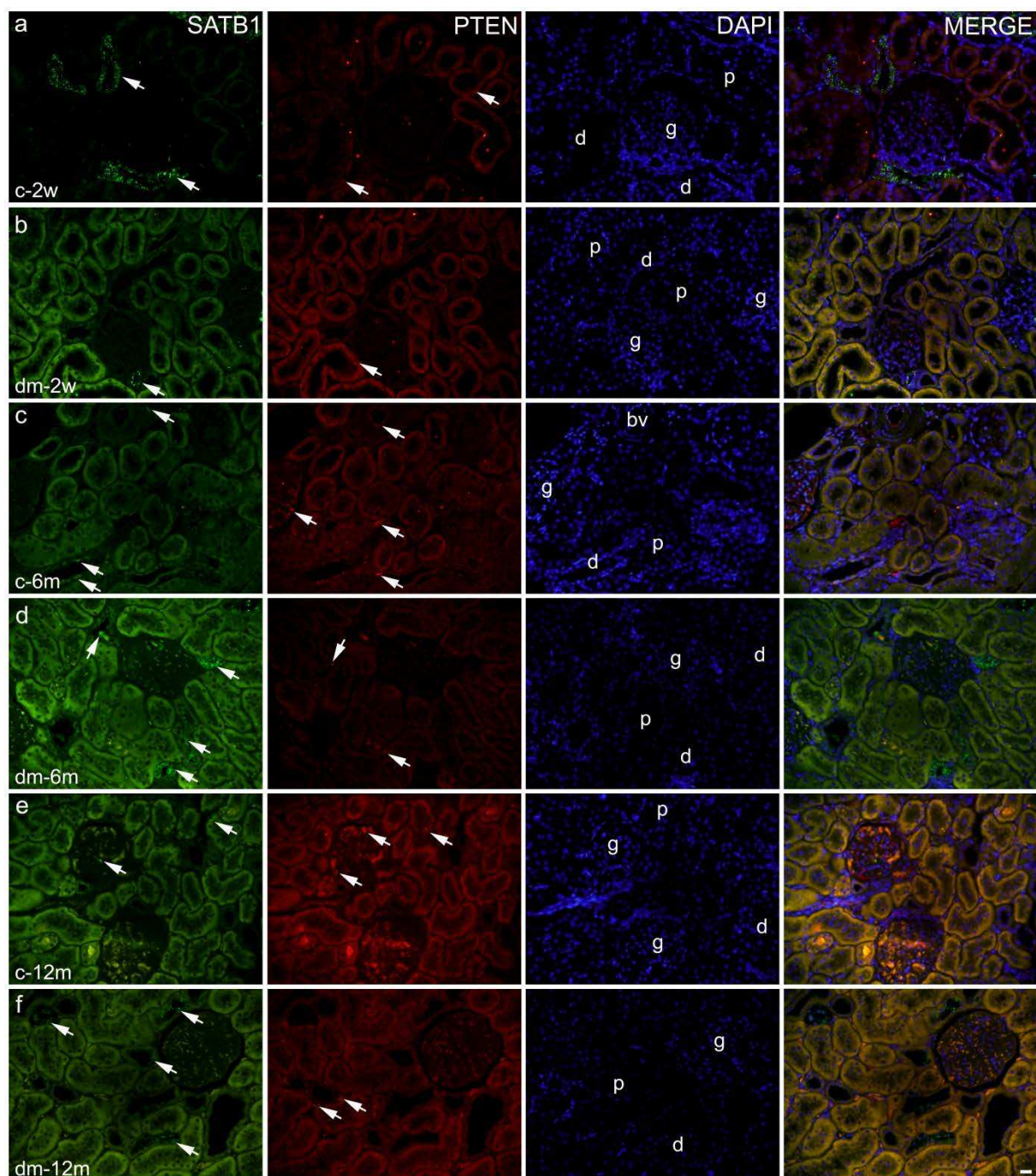
Usporedili smo broj pozitivnih stanica između kontrolnih i dijabetičkih skupina u različitim dijelovima bubrega (glomeruli, PT i DT). Nakon odvojenih analiza za različita područja bubrega za svaku skupinu, podaci su prikupljeni za sva područja bubrega kontrolnih i dijabetičkih štakora, te ponovno analizirani.

3.5 Statistika

Za analizu podataka koristili smo Hi-kvadrat test, a $P < 0,05$ smo uzeli kao statističku značajnost.



Slika 1: Bubrežno tkivo prikazano kroz transverzalne rezove u Mallory bojanju, skala 20 μ m: kora bubrega nakon 2 tjedna kontrolna (a) i dijabetička (b) skupina, nakon 6 mjeseci kontrolna (c) i dijabetička (d) skupina, nakon 12 mjeseci kontrolna (e) i dijabetička (f) skupina, bv-krvna žila, d-distalni tubul, g-glomerul, p-proksimalni tubul, c-kontrolna skupina, dm-dijabetička skupina.



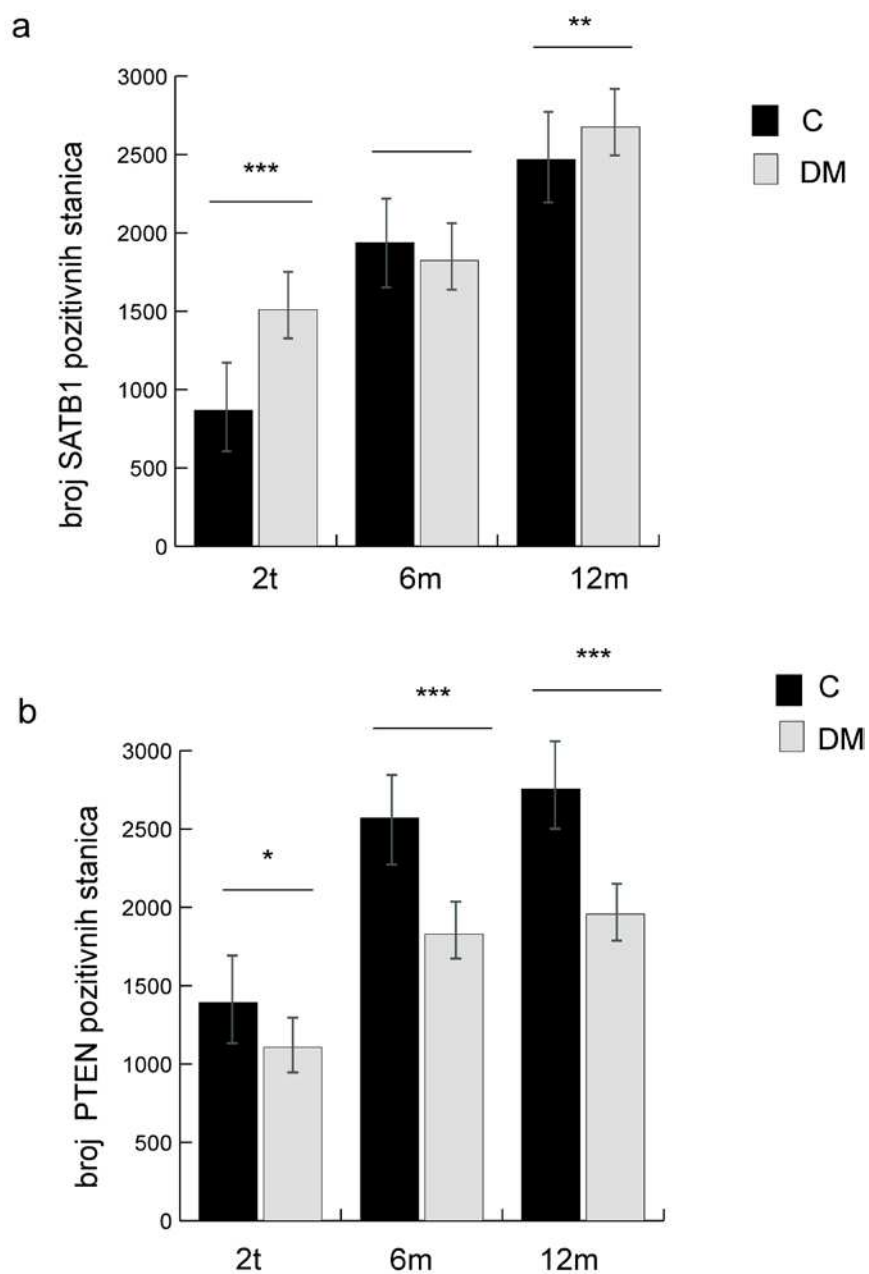
Slika 2: SATB1 pozitivne stanice u različitim područjima bubrežne kore vidljive kao zeleno citoplazmatsko bojanje (strelice), a PTEN pozitivne stanice kao crveno citoplazmatsko bojanje. Kolokalizacija SATB1 i PTEN-a je prikazana u desnoj koloni (kombinacija boja- MERGE). Bubrežna kora kontrolne skupine od 2 tjedna (a), 6 mjeseci (c), 12 mjeseci (e), dijabetičke skupine od 2 tjedna (b), 6 mjeseci (d), 12 mjeseci (f). Skala 20 mm. bv-krvna žila, d-distalni tubul, g-glomerul, p-proksimalni tubul, c-kontrolna skupina, dm-dijabetička skupina.

4. REZULTATI

4.1 Ukupan broj SATB1 i PTEN pozitivnih stanica u bubrezima dijabetičke i kontrolne skupine štakora

Prvo smo analizirali ukupan broj pozitivnih stanica među skupinama (u to su bile uključene sve tri strukture bubrežne kore: glomeruli, PT i DT), i to za SATB1. U kontrolnim skupinama (C-2t, C-6m, C-12m) je bio veći izražaj SATB1 što je vrijeme više prolazilo ($p < 0.0001$) (Slika 3a). U dijabetičkim skupinama (DM-2t, DM-6m, DM-12m) je također bilo značajne razlike ($p < 0.0001$) (Slika 3a). Ako uspoređujemo pojedinačno skupine DM-2t i DM-6m nije bilo značajne razlike u ukupnom broju pozitivnih stanica ($p = 0.4431$) (Slika 3a). Usporedbom skupina DM-2t i DM-12m bilo je više pozitivnih stanica u DM-12m ($p < 0.0001$). Isti nalaz imamo ako uspoređujemo skupine DM-6m i DM-12m ($p < 0.0001$) (Slika 3a). Značajna razlika je utvrđena između kontrolne i dijabetičke skupine nakon 2 tjedna šećerne bolesti (C-2t i DM-2t), s više pozitivnih stanica u dijabetičkoj skupini ($p < 0.0001$), (Slika 3a). Nije bilo značajne razlike u broju pozitivnih stanica između kontrolne i dijabetičke skupine štakora nakon 6 mjeseci ($p = 0.2644$). Nakon 12 mjeseci veći broj pozitivnih stanica je bio u dijabetičkoj skupini ($p < 0.001$), (Slika 3a).

U kontrolnim skupinama (C-2t, C-6m, C-12m) je bio prisutan najveći broj pozitivnih stanica za PTEN nakon 12 mjeseci ($p < 0.0001$) (Slika 3b). Isto vrijedi i za dijabetičke skupine ($p < 0.0001$) (Slika 3b). Kada smo uspoređivali kontrolnu i dijabetičku skupinu nakon 2 tjedna (C-2t i DM-2t), bilo je više PTEN pozitivnih stanica u kontrolnoj skupini ($p < 0.01$), (Slika 3b). Isti nalaz vidimo i u skupinama nakon 6 mjeseci, s većim brojem PTEN pozitivnih stanica u kontrolnoj skupini ($p < 0.0001$) (Slika 3b). I nakon 12 mjeseci šećerne bolesti, uspoređujući kontrolnu i dijabetičku skupinu štakora, u kontrolnoj se bilježi veći broj pozitivnih stanica ($p < 0.0001$), (Slika 3b).



Slika 3: Broj SATB1 (a) i PTEN (b) pozitivnih stanica u 2 tjedna (2t), 6 mjeseci (6m) i 12 mjeseci (12m) u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM). Podaci su prikazani kao prosjek $\pm$ SD, hi-kvadrat test. Zvezdice označavaju značajnu razliku * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$.**

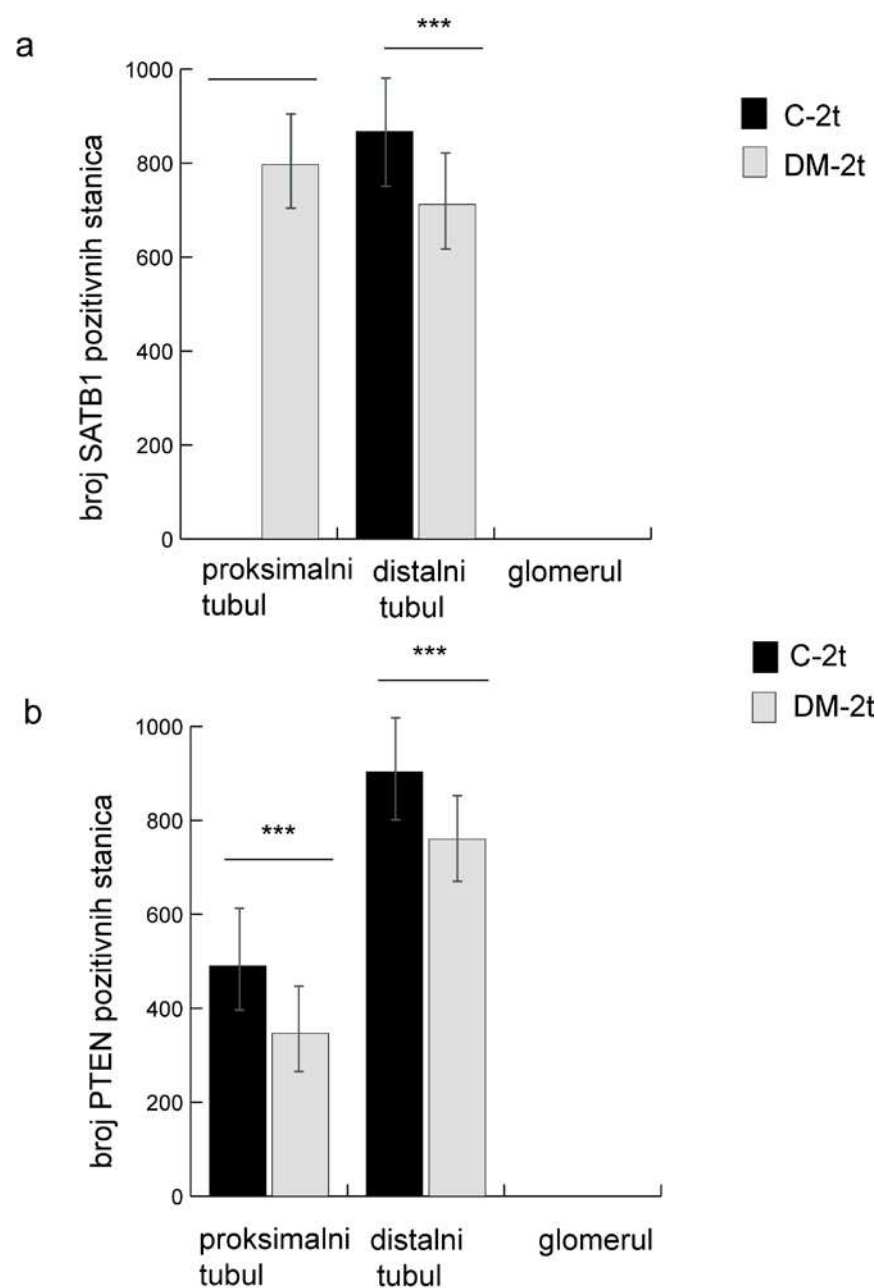
4.2 SATB1 i PTEN pozitivne stanice u različitim dijelovima kontrolnih i dijabetičkih bubrega

Nakon 2 tjedna šećerne bolesti u glomerulima nije bilo SATB1 ni PTEN pozitivnih stanica u kontrolnim i dijabetičkim štakorima (Slika 4a i b). U proksimalnim tubulima dijabetički štakori su imali pozitivne stanice SATB1 (Slika 4a), a kontrolni štakori pozitivne stanice PTEN-a ($p < 0.0001$) (Slika 4b). U distalnim tubulima kontrolna skupina štakora je imala više pozitivnih stanica i SATB1 i PTEN-a ($p < 0.0001$) (Slika 4a i b).

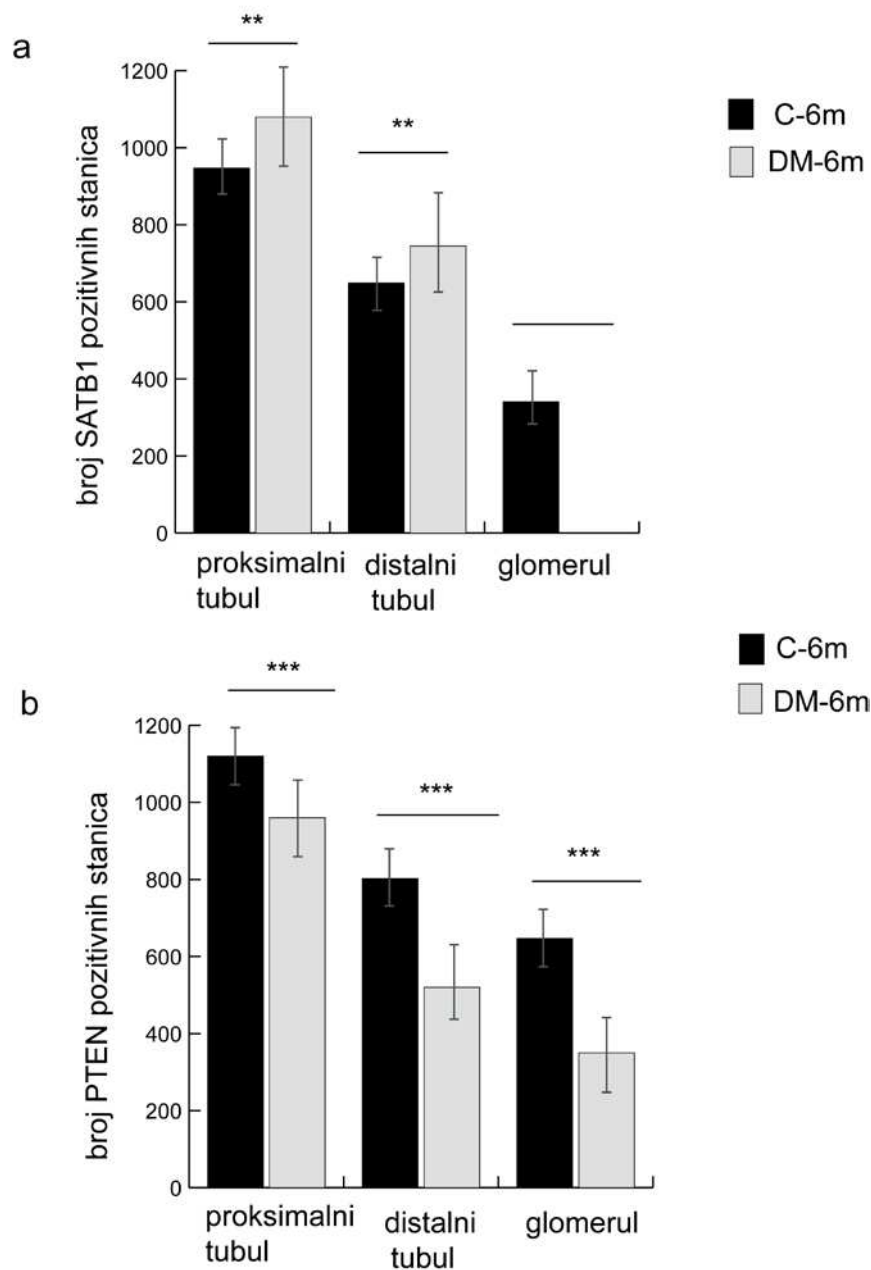
Nakon 6 mjeseci SATB1 pozitivne stanice u glomerulima su bile prisutne jedino u kontrolnoj skupini štakora (Slika 5a). U proksimalnim i distalnim tubulima vidimo značajan porast pozitivnih SATB1 stanica u dijabetičkim skupinama ($p < 0.001$) (Slika 5a). U svim dijelovima bubrega bio je veći izražaj PTEN-a u kontrolnim skupinama ($p < 0.0001$) (Slika 5b). Nakon 12 mjeseci šećerne bolesti pratimo značajan porast broja SATB1 pozitivnih stanica u glomerulima dijabetičke skupine ($p < 0.0001$) (Slika 6a), dok je u kontrolnim skupinama bio veći broj PTEN pozitivnih stanica ($p < 0.01$) (Slika 6b). U proksimalnim i distalnim tubulima kontrolne skupine su imale veći broj PTEN pozitivnih stanica ($p < 0.0001$), dok za SATB1 nije bilo značajne razlike (Slika 6a i b).

4.3 SATB1 i PTEN pozitivne stanice u kontrolnim i dijabetičkim skupinama

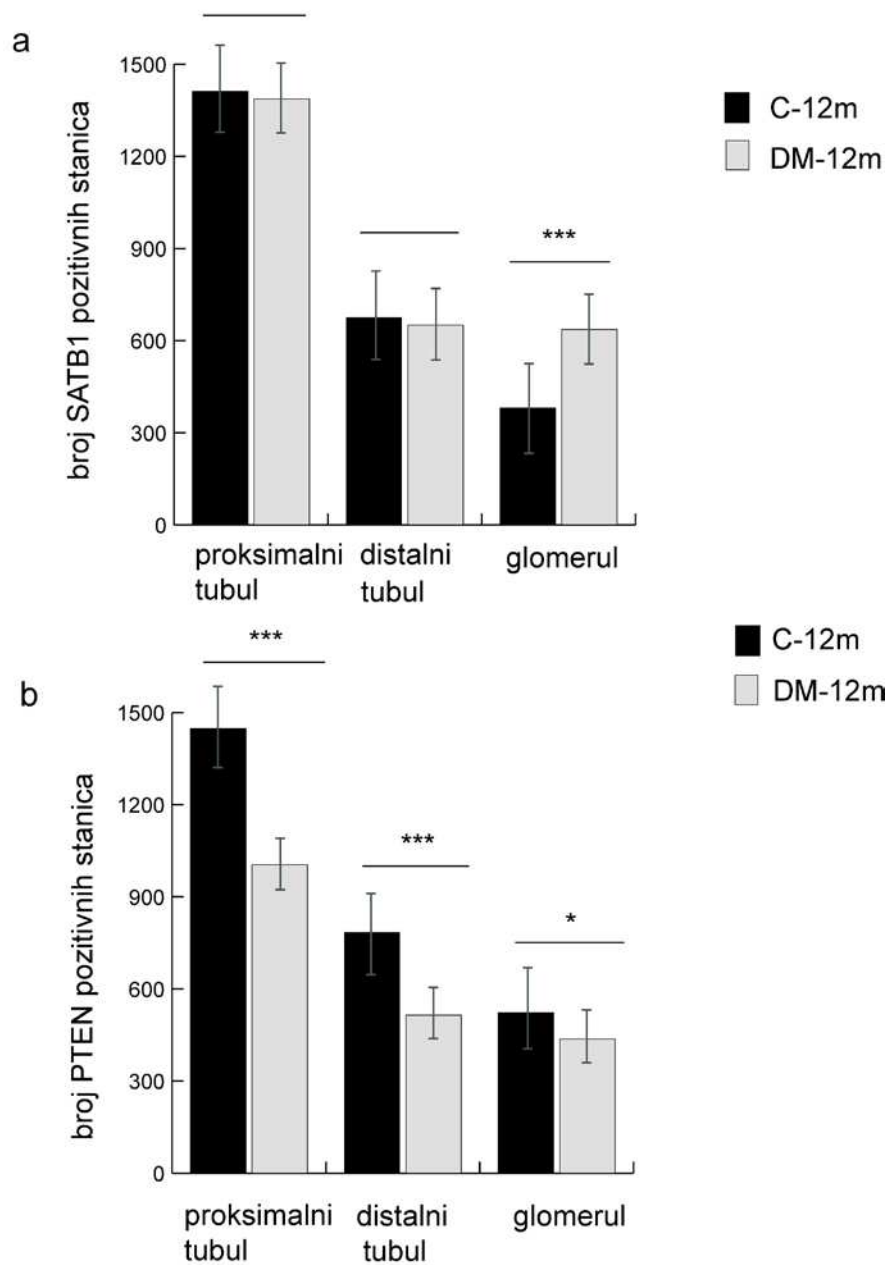
Na kraju smo usporedili broj SATB1 i PTEN pozitivnih stanica u istom vremenskom intervalu i među istim skupinama, te potvrdili očekivane rezultate (Slika 7). U kontrolnoj skupini nakon 2 tjedna bilo je više PTEN pozitivnih stanica u usporedbi sa SATB1 ($p < 0.0001$) (Slika 7a). Isti rezultat nakon 6 mjeseci ($p < 0.001$) (Slika 7a). I nakon 12 mjeseci u kontrolnoj skupini je veći broj PTEN pozitivnih stanica ($p < 0.01$) (Slika 7a). U dijabetičkoj skupini nakon 2 tjedna prati se veći broj SATB1 pozitivnih stanica ($p < 0.001$) (Slika 7b). Nakon 6 mjeseci u dijabetičkim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u broju pozitivnih stanica za SATB1 i PTEN ($p < 0.08758$) (Slika 7b). Nakon 12 mjeseci veći broj SATB1 pozitivnih stanica u dijabetičkim skupinama ($p < 0.0001$) (Slika 7b).



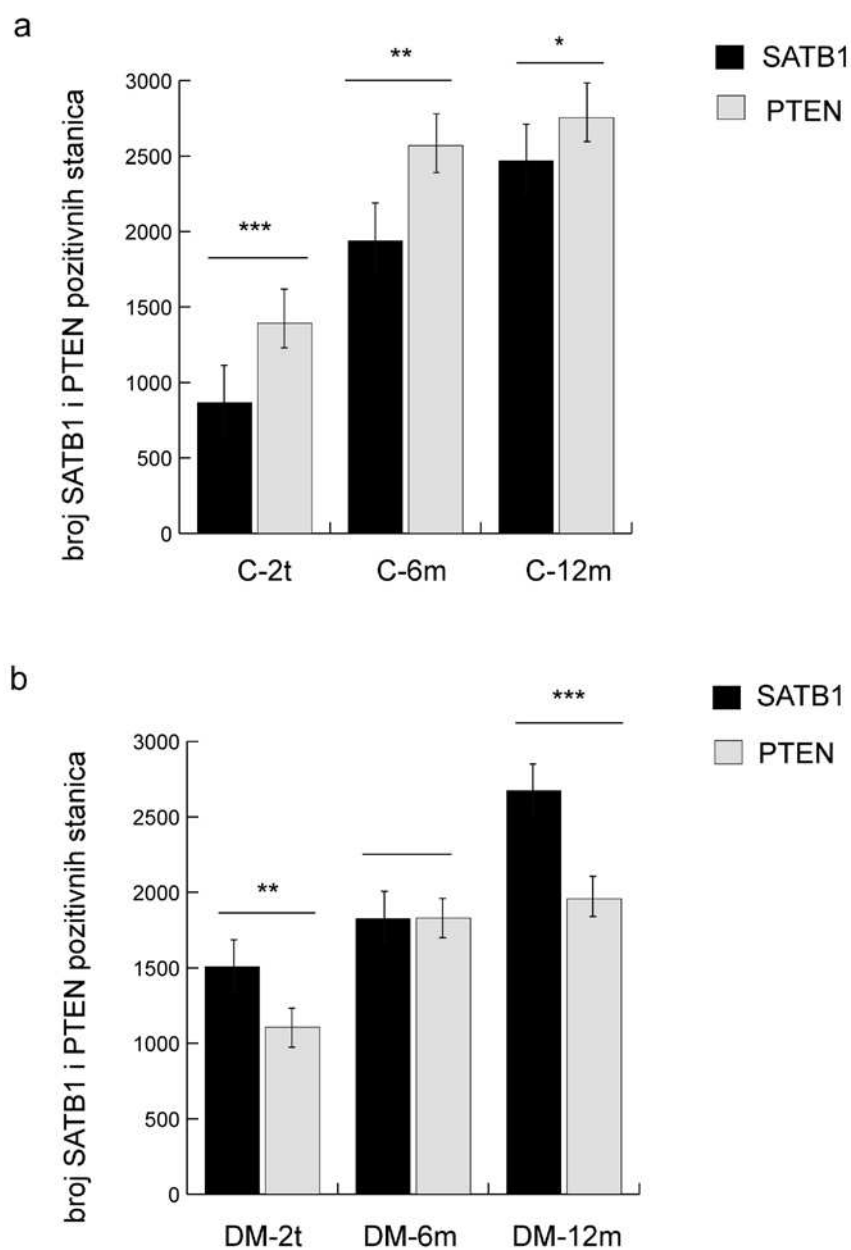
Slika 4: Broj SATB1 (a) i PTEN (b) pozitivnih stanica u 2 tjedna (2t) u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u proksimalnim tubulima, distalnim tubululima i glomerulima. Podaci su prikazani kao prosjek $\pm$ SD, hi-kvadrat test. Zvezdice označavaju značajnu razliku * $P < 0.001$.**



Slika 5: Broj SATB1 (a) i PTEN (b) pozitivnih stanica u 6 mjeseci (6m) u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u proksimalnim tubulima, distalnim tubulima i glomerulima. Podaci su prikazani kao prosjek $\pm$ SD, hi-kvadrat test. Zvezdice označavaju značajnu razliku ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$.**



Slika 6: Broj SATB1 (a) i PTEN (b) pozitivnih stanica u 12 mjeseci (12m) u kontrolnoj (C) i dijabetičkoj skupini (DM) u proksimalnim tubulima, distalnim tubulima i glomerulima. Podaci su prikazani kao prosjek $\pm$ SD, hi-kvadrat test. Zvezdice označavaju značajnu razliku * $P < 0.05$, * $P < 0.001$.**



Slika 7: Broj SATB1 i PTEN pozitivnih stanica u kontrolnim grupama (a) i dijabetičkim grupama (b) u 2 tjedna, 6 i 12 mjeseci (C-2t, C-6m, C-12m), (DM-2t, DM-6m, 12m). Podaci su prikazani kao prosjek $\pm$ SD, hi-kvadrat test. Zvezdice označavaju značajnu razliku * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$.**

4.4 Semi-kvantifikacija SATB1 i PTEN inteziteta bojanja kroz bubrege

Slikovni prikaz semi-kvantifikacije inteziteta bojanja vidimo u Tablici 1. DM-2t i DM-6m skupine su imale snažni izražaj SATB1 u svim dijelovima bubrega, osim glomerulima, dok je u skupini C-2t postojao jaki granularni izražaj SATB1 samo u distalnim tubulima. U skupini C-6m srednji granularni izražaj SATB1 je bio prisutan kroz bubrege. Izražaj SATB1 nakon 12 mjeseci je bio srednje prisutan u obje skupine, s povremenim granularnim izražajem SATB1 u distalnim tubulima u dijabetičkoj skupini, posebno u području makule dense.

U skupinama C-2t i DM-2t bio je prisutan snažni izražaj PTEN-a u svim dijelovima bubrega, osim u glomerulima, dok je u parijetalnom sloju Bowmanove čahure bio srednji izražaj u obje skupine. Skupina C-6m je imala snažni izražaj PTEN-a u svim analiziranim dijelovima bubrega, pozitivno PTEN bojanje u zdravim glomerulima je bilo najviše prisutno u podocitima i krvnim žilama glomerula i intersticija. U skupini DM-6m pratimo srednji izražaj PTEN-a u svim analiziranim strukturama, a glomeruli su bili podvrgnuti izraženijoj glomerulosklerozi. Isti intezitet bojanja za PTEN kao kod skupine C-6m pratimo i u skupini C-12m. U skupini DM-12m u svim analiziranim strukturama prati se srednji izražaj PTEN-a, dok je u intersticiju i krvnim žilama izražaj bio veći.

Tablica 1. Semi-kvantifikacija inteziteta bojanja primarnih protutijela kroz bubrežno tkivo
(c-kontrolna skupina, dm-dijabetička skupina)

	Glomeruli	Proksimalni tubuli	Distalni tubuli	Makula densa	Sabirni kanalići	Krvne žile	Intersticij
SATB1 c-2t	-	-	++	-	-	-	-
SATB1 dm-2t	-	++	++	++	++	++	++
SATB1 c-6m	+	+	+	+	+	+	+
SATB1 dm-6m	-	++	++	++	++	++	++
SATB1 c-12m	+	+	+	+	+	+	+
SATB1 dm-12m	+	+	++	++	+	+	+
PTEN c-2t	-	++	++	++	++	++	++
PTEN dm-2t	-	++	++	++	++	++	++
PTEN c-6m	++	++	++	++	++	++	++
PTEN dm-6m	+	+	+	+	+	+	+
PTEN c-12m	++	++	++	++	++	++	++
PTEN dm-12m	+	+	+	+	+	++	++

Intezitet bojanja: odsutan -, srednji +, jaki ++

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju je analiziran izražaj SATB1 i PTEN-a u bubrezima dijabetičkih i kontrolnih štakora različitih dobnih skupina. Ovo je prvo istraživanje u kojem se opisuje i prebrojava izražaj ova dva biljega u bubrezima dijabetičkih i kontrolnih štakora tijekom starenja u tako dugom vremenskom razdoblju. U zdravim stanicama i tkivima koji su odgovorni za regulaciju tvorbe strukture kromatina i izražaj gena specifičnih za tkivo nalazi se neznatčan izražaj SATB1 (44, 45). U našem istraživanju, izražaj SATB1 se skoro podvostručio nakon 2 tjedna šećerne bolesti u usporedbi s kontrolom. Ovaj nalaz je značajan jer nam ukazuje da je oštećenje prisutno već nakon 2 tjedna šećerne bolesti, a povećava se s vremenom, te prati promjene uzrokovane starenjem. To može predstavljati gubitak kompenzatornog mehanizma bubrega uslijed oštećenja. Nakon 6 mjeseci izražaj SATB1 je bio podjednak u obje grupe, no nakon 12 mjeseci opet se prati povećan izražaj SATB1 u dijabetičkoj skupini štakora.

Kada smo analizirali različita područja bubrega bilo je značajnih razlika. Najzanimljiviji nalaz je iznimno veliki izražaj SATB1 u proksimalnim tubulima dijabetičke skupine štakora nakon 2 tjedna, bez ikakve prisutnosti biljega u proksimalnim tubulima kontrolne skupine. Iako je vremenom izražaj SATB1 u proksimalnim tubulima bio velik u obje skupine, ipak je bio veći u dijabetičkoj skupini nakon 6 mjeseci, i opet podjednako izražen u obje skupine nakon 12 mjeseci. S druge strane, u glomerulima nakon 2 tjedna nije bilo izražaja SATB1 ni u jednoj skupini. No, nakon 6 mjeseci prati se izražaj SATB1 u glomerulima kontrolne skupine, a nakon 12 mjeseci veći izražaj SATB1 u dijabetičkim skupinama štakora. Iz ovoga vidimo da se najznačajnije patološke promjene događaju nakon 2 tjedna u proksimalnim tubulima, disfunkcija tubula u smislu smanjenja reasorpcije, dok su glomeruli još uvijek nepromijenjeni. To nam ukazuje da se promjene u glomerulima, zbog šećerne bolesti ili starenja, događaju kasnije (za kontrolnu skupinu nakon 6 mjeseci) sa najvećim izražajem SATB1 nakon 12 mjeseci, pogotovo u dijabetičkim skupinama štakora. Ovo se podudara i sa semikvantitativnom analizom koja pokazuje snažni intenzitet bojanja SATB1 u oštećenim sklerotičnim glomerulima nakon 12 mjeseci šećerne bolesti.

Kada smo uspoređivali oba biljega u istim skupinama, SATB1 je bio više izražen u dijabetičkim skupinama, a PTEN u kontrolnim. Drugo istraživanje je pokazalo da odsustvo PTEN-a u β stanicama kod mišjih modela dovodi do značajnog povećanja ukupne mase oštećenih otočića u gušterači (71). Smanjen izražaj PTEN-a je utvrđen i u mezangijskim stanicama i podocitima dijabetičkih miševa i također kod bolesnika sa dijabetičkom bolesti

bubrega (66). Isto je nađeno u bubrežnim tubularnim epitelnim stanicama koje su promijenjene zbog šećerne bolesti, što je dovelo do prekomjerne aktivacije PI3K-PKB/Akt puta pomoću TGF- β 1 koji pomaže u započinjanju i napredovanju dijabetičke bolesti bubrega (67). U jednom provedenom istraživanju izražaj PTEN-a je bio znatno smanjen u tubulima i intersticiju oštećenih bubrega, i gubitkom PTEN-a je započela tubularna disfunkcija (68). I u ovom istraživanju bilježi se smanjen izražaj PTEN-a u dijabetičkih štakora nakon 12 mjeseci utjecaja šećerne bolesti. Izražaj PTEN-a je bio smanjen i u različitim dijelovima bubrega-glomerulima, proksimalnim i distalnim tubulima u dijabetičkim skupinama štakora u sva tri vremenska intervala koja smo istraživali. Smanjen izražaj PTEN-a posreduje proizvodnji izvanstaničnog bubrežnog matriksa preko aktivacije Acta, a smatra se da bi regulacija PTEN-a mogla biti potencijalni put za smanjenje razvoja bubrežne fibroze u kroničnoj bubrežnoj bolesti (69). Wang i ostali su dokazali značajno smanjen izražaj PTEN-a u dijabetičkoj skupini štakora nakon 12 mjeseci (67). Lin i ostali su istraživanje proveli na mišjem modelu šećerne bolesti gdje je izražaj PTEN-a bio smanjen u mezangijskim stanicama, doprinoseći širenju mezangijskog matriksa, no ostalo je još uvijek nejasno kako PTEN utječe na razvoj dijabetičke bolesti bubrega u podocitima (66). Također su otkrili da gubitak inzulinskih receptora u podocitima smanjuje IRS1-povezanu PI3K aktivnost što je praćeno apoptozom podocita i glomerulosklerozom (66). Zhu i ostali su pokazali da PTEN regulira bubrežni izvanstanični matriks u šećernoj bolesti preko povećanog faktora rasta vezivnog tkiva (CTGF) (69).

Mnoge promjene koje se događaju u stanicama tijekom dijabetičke bolesti bubrega su još uvijek nerazjašnjene. Wu i ostali su pokazali, u svom istraživanju sa štakorima starim 1,4 i 8 tjedana, da poremećaji autofagije mogu doprinijeti ranom razvoju dijabetičke bolesti bubrega, te da je autofagija važna za regulaciju stanične homeostaze u bubrežima (72). Menini i ostali su pokazali da je glomerularna stanična apoptoza bila veća kod dijabetičkih štakora u usporedbi s kontrolnim poslije 4 i 6 mjeseca, ali nema podataka za 12 mjeseci (73). Zaključili su da se prije apoptoze glomerularnih stanica, koja je zadnji stadij oštećenja, događa glomerularna hipertrofija, podocitopatija i proteinurija koje vode do ekspanzije mezangija i glomerularne skleroze (73). I druga istraživanja su pokazala slične nalaze, sa štakorima nakon 4 i 8 tjedana, te 6 mjeseci, gdje autori tvrde da je glomerularna apoptoza nakon 6 mjeseci šećerne bolesti uzrokovana preko MIB-5 pozitivnosti što može voditi do glomerularne skleroze (74). Ovo je u skladu s našim zapažanjima o izražaju SATB1 i PTEN-a u ovim strukturama.

Izražaj SATB1 i PTEN-a je također povezan sa tumorogenezom. PTEN, suprotno od SATB1, ima zaštitnu ulogu u tumorogenezi preko suprimiranja aktivnosti PI3 Kinaza/AKT signalnog puta (58). Uloga PI3K/AKT signalnog puta je reagiranje na mitogene podražaje, aktivacija unutarstanične kaskade fosforilacije, što vodi staničnoj proliferaciji i povećava preživljenje. PTEN ograničava njegovu aktivnost, i tako djeluje kao tumor supresor (58, 59). Osim toga, započinje apoptotske puteve i zaustavlja stanični ciklus (61). Istraživanja su pokazala gubitak izražaja PTEN-a u nekoliko vrsta tumora, kao u tumorima mozga i dojke, dok je nasljedni gubitak PTEN-a viđen u Cowdenovom sindromu koji je karakteriziran hiperproliferacijom dobroćudnih i zloćudnih tumora (59, 75).

6. ZAKLJUČAK

Naši rezultati pokazuju da se najveće promjene u izražaju oba biljega događaju već 2 tjedna nakon pojave šećerne bolesti, posebice u proksimalnim tubulima, što ukazuje na rano pojavljivanje patofizioloških promjena u dijabetičkim bubrezima, što bi se normalno događalo starenjem. To nam pokazuje i da dijabetička bolest bubrega potječe iz proksimalnih tubula (PT), suprotno prethodnim uvjerenjima da je pogoršanje funkcije podocita početno mjesto oštećenja, te disfunkcija proksimalnih tubula dovodi do oštećenja glomerularne filtracijske membrane i mikroalbuminurije (76). Stoga, različiti biljezi koji utječu na funkciju proksimalnih tubula važni su u stvaranju novih modaliteta liječenja. Uspoređujući dijabetičke i kontrolne skupine štakora tijekom starenja vidimo da se veće promjene u izražaju ovih biljega događaju kod dijabetičkih štakora, što ukazuje na veće oštećenje bubrega uslijed ove bolesti. Daljnje studije o promjenama u bubrezima tijekom starenja će omogućiti uvid u fiziologiju zdravih i dijabetičkih bubrega, te pomoći razjasniti mehanizme kojima se ove promjene događaju.

7. SAŽETAK

Dijabetička bolest bubrega je uobičajena komplikacija šećerne bolesti. Opisujemo izražaj tkivno specifične jezgrine matriks vezajuće bjelančevine SATB1 i fosfataza i tenzinskog homologa PTEN u bubrezima dijabetičkih štakora tijekom starenja.

Mušjaci štakora Sprague Dawley su dobili injekcije streptozotocina 55mg/kg (STZ) (skupina štakora sa šećernom bolesti) ili citratni pufer (kontrolna skupina). Nakon 2 tjedna, 6 i 12 mjeseci analizirano je tkivo bubrega u tri različita područja: glomeruli, proksimalni i distalni tubuli (PT i DT). Tkivo je obojano imunohistokemijski sa SATB1 i PTEN.

Nakon 2 tjedna dijabetički štakori su imali veći izražaj SATB1, a manji izražaj PTEN-a. Nakon 6 i 12 mjeseci PTEN je bio više izražen u kontrolnim skupinama. Nakon 12 mjeseci SATB1 je bio više izražen u dijabetičkih štakora. U glomerulima, PTEN je bio više izražen u kontrolnim skupinama štakora, a kod dijabetičkih štakora se bilježi veći izražaj SATB1, ali tek nakon 12 mjeseci. Izražaj PTEN-a se povećavao od 2 tjedna do 12 mjeseci u proksimalnim i distalnim tubulima kontrolnih skupina. SATB1 je bio izražen isključivo u proksimalnim tubulima dijabetičkih štakora nakon 2 tjedna, a u distalnim tubulima se prati veći izražaj SATB1 u kontrolnim skupinama. Nakon 6 mjeseci u proksimalnim i distalnim tubulima je bio veći izražaj SATB1 kod dijabetičkih štakora.

Glavne promjene u izražaju oba biljega događaju se već nakon 2 tjedna utjecaja šećerne bolesti, osobito u proksimalnim tubulima, što ukazuje na rani početak patofizioloških promjena u dijabetičkim bubrezima, što bi se normalno događalo starenjem. Ova otkrića mogu pridonijeti našem razumijevanju dijabetičke bolesti bubrega i mogućim pravim ciljevima liječenja.

8. SUMMARY

CHANGES IN SATB1 AND PTEN EXPRESSION IN THE KIDNEYS OF DIABETIC RATS DURING AGEING

Diabetic nephropathy (DN) is a common complication of diabetes mellitus (DM). We describe special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1) and phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression in the kidneys of diabetic rats during ageing.

Male Sprague Dawley rats were injected with 55mg/kg streptozotocin (STZ) (DM group) or with citrate buffer (control). Kidneys were collected after 2 weeks, 6 months and 12 months and were analyzed in three different areas: glomeruli, proximal and distal convoluted tubules (PCT and DCT). The sections were stained immunohistochemically, using SATB1 and PTEN.

Significant difference was observed after 2 weeks with more SATB1 expression and less PTEN expression in diabetic rats. PTEN was more expressed in controls after 6 and 12 months. After 12 months SATB1 was more expressed in diabetic rats. In glomeruli, control rats had more expression of PTEN and diabetic rats had more expression of SATB1 only after 12 months. The expression of PTEN was increasing from 2 weeks to 12 months in PCT and DCT of control rats. SATB1 was expressed exclusively in PCT of diabetic rats after 2 weeks, and expression in DCT was higher in controls. After 6 months PCT and DCT had more SATB1 expression in diabetic rats.

The major changes in expression of both markers occur already after 2 weeks of DM, especially in PCT, implying the early onset of pathophysiological changes in diabetic kidneys, which would normally occur with ageing. These findings may contribute to our understanding of changes associated with DN and possible proper treatment modalities.

9. LITERATURA:

1. Cotran RS, Kumar, Vinay, Fausto, Nelson, Robbins, Stanley L, Abbas, Abul K. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 2005.
2. Glodny B UV, Taferner B, et al. Normal kidney size and its influencing factors-a64-slice MDCT study of 1.040 asymptomatic patients. BMC Urology. 2009;9(1):19.
3. Boron WF. Medical Physiology: A cellular and molecular approach. Elsevier/Saunders, editor.; 2004.
4. Emamian SA NM, Pedersen JF, Ytte L. Kidney dimensions at sonography: correlation with age, sex and habitus in 665 adult volunteers. AJR Am J Roentgenol. 1993;160(1):83-6.
5. Clapp W. Renal anatomy. New York, Cambridge University Press; 2009.
6. Bard J, Vize, Peter D, Woolf, Adrian S. The kidney: from normaln development to congenital disease. Boston: Academic press: 154; 2003.
7. Uhlen M, Fagerberg, Linn, Hallstrom, Bjorn M, Lindskog, Cecilia, Oksvold, Per, Mardinoglu, Adil, Sivertsson, Asa, Kampf, Caroline, Sjostedt, Evelina. Tissue-based map of the human proteome. Science. 2005;347(6220):1260419.
8. Habuka M, Fagerberg, Linn, Hallstrom, Bjorn M, Kampf, Caroline, Edlund, Karolina, Sivertsson, Asa, Yamamoto, Tadashi, Ponten, Fredrik, Uhlen, Mathias. The kidney Transcriptome and proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. PLOS ONE. 2014;9(12).
9. Bruce M C. Human Embryology and Development Biology ed r, editor. Saint Louis Mosby; 2004.
10. Thomas SR. Modelling and simulation of the kidney. Journal of Biological Physics and Chemistry. 2005;5:70-83.
11. Kitabchi AE UG, Miles JM, Fisher JN. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. Diabetes Care. 2009;32(7):1335-43.
12. Sherwin R, Jastreboff AM. Year in diabetes 2012: The diabetes tsunami. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Dec;97(12):4293-301.
13. Sheng X, Wang J, Guo J, Xu Y, Jiang H, Zheng C, et al. Effects of Baicalin on Diabetic Cardiac Autonomic Neuropathy Mediated by the P2Y12 Receptor in Rat Stellate Ganglia. Cell Physiol Biochem. Apr 13;46(3):986-98.
14. Pociot F, Lernmark A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. Lancet. 2016 Jun 4;387(10035):2331-9.
15. Cash J. Family Practice Guidelines. 3, editor.: Springer; 2014.
16. Picot J JJ, Colquitt JL, Gospodarevskaya E, Loveman E, Baxter L, Clegg AJ. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systemic review and economic evaluation. Health Technology Assessment. 2009;13(41):1-190, 215-357.
17. Shi Y HF. The global implications of diabetes and cancer. Lancet. 2014;383(9933):1947-8.
18. JD R. Diabetes: Symptoms, Causes, Treatment and Prevention. 2015.
19. C K. When hypogglycemia is not obvious: diagnosing and treating under redognized and undisxlosed hypogglycemia. Primary Care Diabetes. 2014;8(1):3-11.
20. Verrotti A SA, Olivieri C, Chiarelli F. Seizures and type 1 diabetes mellitus: current state of knowledge. European Journal of Endocrinology. 2012;167(6):749-58.
21. Sarwar N GP, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwe CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose

- concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215-22.
22. Tong L, Adler S. Glycemic control of type 2 diabetes mellitus across stages of renal impairment: information for primary care providers. *Postgrad Med*. Apr 18;1-13.
 23. Gilbert JS, Weiner, E.D. *Primer on kidney diseases*. Seventh edition ed.; 2018.
 24. Peasgood T, Brennan A, Mansell P, Elliott J, Basarir H, Kruger J. The Impact of Diabetes-Related Complications on Preference-Based Measures of Health-Related Quality of Life in Adults with Type I Diabetes. *Med Decis Making*. 2016 Aug 23.
 25. 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. *Exp Gerontol*. 2013 Dec;48(12):1473-8.
 26. Singh S, Usman K, Banerjee M. Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2016 Aug 10;7(15):302-15.
 27. Himmelfarb J, Tuttle KR. New therapies for diabetic kidney disease. *N Engl J Med*. 2013 Dec 26;369(26):2549-50.
 28. Marco GS, Colucci JA, Fernandes FB, Vio CP, Schor N, Casarini DE. Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(4):747-54.
 29. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):F287-97.
 30. Longo D FA, Kaper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's manual of medicine 18*, editor. New York: Mc Graw-Hill Medical; 2013.
 31. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001 Jul 21;358(9277):221-9.
 32. Shikata K, Ninomiya T, Kiyohara Y. Diabetes mellitus and cancer risk: review of the epidemiological evidence. *Cancer Sci*. 2013 Jan;104(1):9-14.
 33. Cannata D, Fierz Y, Vijayakumar A, LeRoith D. Type 2 diabetes and cancer: what is the connection? *Mt Sinai J Med*. 2010 Mar-Apr;77(2):197-213.
 34. Zendejdel K, Nyren O, Ostenson CG, Adami HO, Ekbom A, Ye W. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Dec 3;95(23):1797-800.
 35. Shu X, Ji J, Li X, Sundquist J, Sundquist K, Hemminki K. Cancer risk among patients hospitalized for Type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *Diabet Med*. 2010 Jul;27(7):791-7.
 36. Carstensen B, Read SH, Friis S, Sund R, Keskimaki I, Svensson AM, et al. Cancer incidence in persons with type 1 diabetes: a five-country study of 9,000 cancers in type 1 diabetic individuals. *Diabetologia*. 2016 May;59(5):980-8.
 37. Gordon-Dseagu VL, Shelton N, Mindell JS. Epidemiological evidence of a relationship between type-1 diabetes mellitus and cancer: a review of the existing literature. *Int J Cancer*. 2013 Feb 1;132(3):501-8.
 38. Lindblad P, Chow WH, Chan J, Bergstrom A, Wolk A, Gridley G, et al. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*. 1999 Jan;42(1):107-12.
 39. Lippert J, Ritz E, Schwarzbeck A, Schneider P. The rising tide of endstage renal failure from diabetic nephropathy type II--an epidemiological analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(4):462-7.
 40. Perry HM, Jr., Miller JP, Fornoff JR, Baty JD, Sambhi MP, Rutan G, et al. Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patients. *Hypertension*. 1995 Apr;25(4 Pt 1):587-94.
 41. Standards of Medical Care in Diabetes-2017: Summary of Revisions. *Diabetes Care*. Jan;40(Suppl 1):S4-S5.

42. Vona-Davis L, Howard-McNatt M, Rose DP. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev.* 2007 Sep;8(5):395-408.
43. Ding M, Pan J, Guo Z, Liu Q, Yang C, Mao L. SATB1 is a Novel Molecular Target for Cancer Therapy. *Cancer Invest.* Jan 2;36(1):28-36.
44. Alvarez JD, Yasui DH, Niida H, Joh T, Loh DY, Kohwi-Shigematsu T. The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev.* 2000 Mar 1;14(5):521-35.
45. Zhang S, Gao X, Ma Y, Jiang J, Dai Z, Yin X, et al. Expression and significance of SATB1 in the development of breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):3309-17.
46. Kondo M, Tanaka Y, Kuwabara T, Naito T, Kohwi-Shigematsu T, Watanabe A. SATB1 Plays a Critical Role in Establishment of Immune Tolerance. *J Immunol.* 2016 Jan 15;196(2):563-72.
47. Chen H, Takahara M, Oba J, Xie L, Chiba T, Takeuchi S, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of SATB1 in cutaneous malignant melanoma. *J Dermatol Sci.* 2011 Oct;64(1):39-44.
48. Mao L, Yang C, Wang J, Li W, Wen R, Chen J, et al. SATB1 is overexpressed in metastatic prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth and invasion. *J Transl Med.* 2013;11:111.
49. Mir R, Pradhan SJ, Galande S. Chromatin organizer SATB1 as a novel molecular target for cancer therapy. *Curr Drug Targets.* 2012 Dec;13(13):1603-15.
50. Wang M, Yin B, Matsueda S, Deng L, Li Y, Zhao W, et al. Identification of special AT-rich sequence binding protein 1 as a novel tumor antigen recognized by CD8⁺ T cells: implication for cancer immunotherapy. *PLoS One.* 2013;8(2):e56730.
51. Lv JH, Wang F, Shen MH, Wang X, Zhou XJ. SATB1 expression is correlated with beta-catenin associated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2016;17(3):254-61.
52. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7443-54.
53. Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct 15;60(8):1091-9.
54. Cheng C, Wan F, Liu L, Zeng F, Xing S, Wu X, et al. Overexpression of SATB1 is associated with biologic behavior in human renal cell carcinoma. *PLoS One.* 2014;9(5):e97406.
55. Matsumoto CS, Almeida LO, Guimaraes DM, Martins MD, Papagerakis P, Papagerakis S, et al. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget.* Jul 5;7(27):42393-407.
56. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
57. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4240-5.
58. Garfin PM, Nguyen T, Sage J. Loss of Pten Disrupts the Thymic Epithelium and Alters Thymic Function. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149430.
59. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 May;13(5):283-96.

60. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998 Jun 5;280(5369):1614-7.
61. Chaffee BR, Hoang TV, Leonard MR, Bruney DG, Wagner BD, Dowd JR, et al. FGFR and PTEN signaling interact during lens development to regulate cell survival. *Dev Biol*. 2016 Feb 15;410(2):150-63.
62. Osaki M OM, Ito H. The PI3K-Akt pathways: Its functions and alterations in human cancer Apoptosis. 2004;9(6):667-76.
63. Manning BD CL. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell Physiol Biochem*. 2007;129(7):1261-74.
64. Carracedo A PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008;27(41):5527-41.
65. Nicholson KM AN. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signaling*. 2002;14(5):381-95.
66. Lin JS, Shi Y, Peng H, Shen X, Thomas S, Wang Y, et al. Loss of PTEN promotes podocyte cytoskeletal rearrangement, aggravating diabetic nephropathy. *J Pathol*. 2015 May;236(1):30-40.
67. Wang YY, Liu RX, Guo B, Xiao Y, Shi MJ, Pi MJ, et al. [Down-regulation of PTEN expression in kidney and its role in development of diabetic nephropathy in rats]. *Sheng Li Xue Bao*. 2011 Aug 25;63(4):325-32.
68. Samarakoon R, Helo S, Dobberfuhl AD, Khakoo NS, Falke L, Overstreet JM, et al. Loss of tumour suppressor PTEN expression in renal injury initiates SMAD3- and p53-dependent fibrotic responses. *J Pathol*. 2015 Aug;236(4):421-32.
69. Zhu L, Zhao S, Liu S, Liu Q, Li F, Hao J. PTEN Regulates Renal Extracellular Matrix Deposit via Increased CTGF in Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem*. 2016 May;117(5):1187-98.
70. Ali A, Mishra PK, Sharma S, Arora A, Saluja SS. Effects of PTEN gene alteration in patients with gallbladder cancer. *Cancer Genet*. 2015 Dec;208(12):587-94.
71. Bayan JA, Peng Z, Zeng N, He L, Chen J, Stiles BL. Crosstalk Between Activated Myofibroblasts and beta Cells in Injured Mouse Pancreas. *Pancreas*. 2015 Oct;44(7):1111-20.
72. Wu WH, Zhang MP, Zhang F, Liu F, Hu ZX, Hu QD, et al. The role of programmed cell death in streptozotocin-induced early diabetic nephropathy. *J Endocrinol Invest*. 2011 Oct;34(9):e296-301.
73. Menini S, Iacobini C, Oddi G, Ricci C, Simonelli P, Fallucca S, et al. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia*. 2007 Dec;50(12):2591-9.
74. Pesce C, Menini S, Pricci F, Favre A, Leto G, DiMario U, et al. Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental diabetes mellitus. *Nephron*. 2002 Apr;90(4):484-8.
75. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50.
76. Gilbert RE, Akdeniz A, Weitz S, Usinger WR, Molineaux C, Jones SE, et al. Urinary connective tissue growth factor excretion in patients with type 1 diabetes and nephropathy. *Diabetes Care*. 2003 Sep;26(9):2632-6.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Ivana Kristina Delić Jukić

Adresa: Don Lovre Katića 26, Solin 21210

Telefon: 098 900-0160

Elektronička pošta: ikdelic@yahoo.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 13.05.1990., Split

IZOBRAZBA

Školovanje, znanstvena i stručna izobrazba:

Osnovna škola: 1996.-2004., Split

Srednja škola: 2004.-2008., 1. jezična gimnazija, Split

Fakultet: 2008.-2014., Medicinski Fakultet, Sveučilište u Splitu

Poslijediplomski studij: 2015.-2018., Biologija novotvorina, Medicinski Fakultet, Sveučilište u Splitu

Specijalizacija: 2015.- danas, nefrologija, Klinički odjel za nefrologiju i hemodijalizu, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Split

Seminari, stručni skupovi, kongresi:

- Odabrana poglavlja iz kliničke farmakologije, Split 25.04.2015.
- Dijagnostičke metode u pulmologiji, Komiža, 30.05.2015.
- Fabry škola Split, Split, 18.03.2016.
- Simpozij nefrološko učilište, Zadar, 24.04.2016.
- P vri splitski kardiološki djir-abeceda atrijske fibrilacije, Split 21.06.2016.
- Novi izazovi u prevenciji bolesti dječje dobi, Šibenik, 12.03.2017.
- Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, Split, 28.04.2017.
- Pulmologija kroz primjere iz prakse 27.05.2017.
- Izazovi u liječenju anemije 05.12.2017.
- Dijabetes u srcu 09.03.2017.
- Diferencijalna dijagnostika trombotičkih mikroangiopatija, cistinoze, cistinurije i ANCA vaskulitisa u djece 16.03.2018.
- Multidisciplinarni pristup kardiološkom, pulmološkom i gastroenterološkom pacijentu

25.03.2018.

Zaposlenja:

Pripravnički staž, KBC Split 2014.-2015.

Zavod za hitnu medicinu 2015.

Specijalizacija iz nefrologije, 2015.-

Članstva:

Hrvatska liječnička komora

Hrvatska udruga bolničkih liječnika

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo za nefrologiju, transplantaciju i dijalizu

ERA-EDTA (European renal association, European dialysis and transplant association)

MATERINSKI JEZIK

- hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- engleski jezik
- talijanski jezik