UTJECAJ SPOLA I KASTRACIJE NA IZRAŽENOST I RASPODJELU PRIJENOSNIKA GLUKOZE KROZ EPITEL TANKOGA CRIJEVA SVINJE

Pavić, Mirela

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:959820

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Mirela Pavić

UTJECAJ SPOLA I KASTRACIJE NA IZRAŽENOST I RASPODJELU PRIJENOSNIKA GLUKOZE KROZ EPITEL TANKOGA CRIJEVA SVINJE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Mirela Pavić

INFLUENCE OF GENDER AND CASTRATION ON THE EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF TRANSPORTERS INVOLVED IN TRANSEPITHELIAL GLUCOSE TRANSPORT IN PORCINE SMALL INTESTINE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Mirela Pavić

UTJECAJ SPOLA I KASTRACIJE NA IZRAŽENOST I RASPODJELU PRIJENOSNIKA GLUKOZE KROZ EPITEL TANKOGA CRIJEVA SVINJE

DOKTORSKI RAD

Mentori:
doc. dr. sc. Hrvoje Brzica
prof. dr. sc. Marcela Šperanda

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Mirela Pavić

INFLUENCE OF GENDER AND CASTRATION ON THE EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF TRANSPORTERS INVOLVED IN TRANSEPITHELIAL GLUCOSE TRANSPORT IN PORCINE SMALL INTESTINE

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
doc. dr. sc. Hrvoje Brzica
prof. dr. sc. Marcela Šperanda

Zagreb, 2017.

SAŽETAK

UTJECAJ SPOLA I KASTRACIJE NA IZRAŽENOST I RASPODJELU PRIJENOSNIKA GLUKOZE KROZ EPITEL TANKOGA CRIJEVA SVINJE

Prijenosnik glukoze ovisan o natriju 1 (SGLT1) prenosi glukozu kroz četkastu membranu u tankom crijevu, dok je za izlazak glukoze iz enterocita na bazolateralnoj membrani odgovoran prijenosnik glukoze neovisan o natriju 2 (GLUT2). Natrij-kalijeva crpka (Na/K-ATPaza), smještena na bazolateralnoj membrani, aktivno izbacuje iz stanice višak natrijevih iona apsorbiranih zajedno s glukozom. Izraženost i raspodjela Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu opisana je većinom u laboratorijskih glodavaca, dok podataka za svinje manjka. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 do sada se nisu uspjele utvrditi u probavnom sustavu laboratorijskih životinja. Istraživanje je provedeno na 20 svinja pasmine švedski landras podijeljenih u četiri skupine: mužjaci, ženke, kastrirani mužjaci i kastrirane ženke. Uzorci tkiva uzeti od pojedinih dijelova tankog crijeva, duodenuma, jejunumu i ileuma, analizirani su imunohistokemijskom metodom, *western*-analizom i lančanom reakcijom polimeraze. Potvrđen je opisani stanični smještaj za Na/K-ATPazu i GLUT2 na bazolateralnim membranama te za SGLT1 na četkastim membranama enterocita. Izraženost Na/K-ATPaze na razini proteina pokazuje spolne razlike (mužjaci < ženke), dok postojanje spolnih razlika na razini mRNK nije dokazano. Izraženost SGLT1 na razini proteina ne pokazuje spolne razlike, dok je postojanje spolnih razlika uočeno na razini mRNK (mužjaci > ženke). Izraženost GLUT2 na razini proteina, slično kao i Na/K-ATPaza pokazuje spolne razlike (mužjaci < ženke), dok je postojanje spolnih razlika na razini mRNK uočeno samo u ileumu. Uočene spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATPaze i GLUT2 nastaju zbog inhibitornog učinka muških spolnih hormona na posttranskripcijskoj razini u tankom crijevu svinje, dok SGLT1 pokazuje drugačije molekularne značajke, bez spolnih razlika u izraženosti. Izraženost funkcionalno povezane Na/K-ATPaze i SGLT1 raste od duodenuma prema ileumu, dok GLUT2 ima najvišu izraženost u jejunumu. Ovakva raspodjela prijenosnika uključenih u prijenos glukoze upućuje na to da se većina glukoze apsorbira u jejunumu i ileumu svinja.

Ključne riječi: apsorpcija glukoze, tanko crijevo, Na/K-ATPaza, SGLT1, GLUT2, spolne razlike

EXTENDED ABSTRACT

INFLUENCE OF GENDER AND CASTRATION ON THE EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF TRANSPORTERS INVOLVED IN TRANSEPITHELIAL GLUCOSE TRANSPORT IN PORCINE SMALL INTESTINE

INTRODUCTION

Sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) transfers glucose across the brush border membrane of the small intestine, while the basolateral sodium-independent glucose transporter 2 (GLUT2) transfers the glucose out of the enterocyte. Sodium-potassium pump (Na/K-ATPase), located on the basolateral membrane, actively transfers excessive sodium ions out of the cell co-absorbed with glucose. The expression and distribution of Na/K-ATPase, SGLT1 and GLUT2 in the small intestine were predominantly investigated in laboratory rodents, while data for pigs are still lacking. Although gender differences in the expression of Na/K-ATPase, SGLT1 and GLUT2 were described in kidneys, lungs and brain of laboratory rodents, so far there are no reports of differences in the digestive system. As the anatomy and physiology of the porcine digestive system is similar to the humans', the porcine model gains on importance. The aim of this study is to investigate gender differences in the expression, effect of castration and distribution of Na/K-ATPase, SGLT1 and GLUT2 in the small intestine of pigs.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted on 20 pigs Swedish Landrace breed divided into 4 groups (males, females, castrated males, castrated females) with 5 animals in each group. At the age of 10 months the pigs were slaughtered for commercial use and tissue samples of small intestine parts, duodenum, jejunum and ileum, were taken and analyzed by immunostaining of tissue cryosections, Western blotting and polymerase chain reaction (PCR). Tissue cyosections went first through the antigen retrieval technique to maximize the antibody-binding sites. Immunostaining following these procedures included incubation of cryosections in specific primary Na/K-ATPase, SGLT1 and GLUT2 antibodies and matching secondary antibodies.

The stained sections were examined and photographed by fluorescence microscope. Isolation of total cell membranes (TCM) by differential centrifugation method and measurement of TCM proteins by the Bradford assay was performed prior Western blotting. Proteins of the prepared samples of TCM were first separated by electrophoresis and then electrophoretically wet-transferred to a blotting membrane. The blotting membranes were incubated with specific primary Na/K-ATPase, SGLT1 and GLUT2 antibodies and matching secondary antibodies. The protein bands on the blotting membrane were visualized by colorimetric assay and the protein bands were densitometrically measured. Total cellular RNA was isolated from the tissue samples. First-strand cDNA synthesis was performed by reverse transcription of RNA. PCR was performed using first-strand cDNA and specific Na/K-ATPase, SGLT1 and GLUT2 primers. PCR products were detected in agarose gel and the obtained bands were densitometrically measured.

RESULTS

The previous described cellular localization for Na/K-ATPase and GLUT2 on basolateral membranes and for SGLT1 on the brush-border membrane of the enterocytes were confirmed. The expression of Na/K-ATPase at the protein level shows gender differences (males < females), while the existence of gender differences at the mRNA level was not detected. The expression of SGLT1 at the protein level does not show gender differences, while the existence of gender differences is observed at mRNA level (male > females). The expression of GLUT2 at the protein level, similar to Na/K-ATPase, shows gender differences (males < females), whereas the existence of gender differences at mRNA level was observed only in ileum. The distribution of functionally related transporters Na/K-ATPase and SGLT1 showed an increase in expression from the duodenum to the ileum, while GLUT2 had the highest expression in jejunum and the lowest in duodenum of the pig.

CONCLUSION

Results of this study showed that the observed gender differences in expression of Na/K-ATPase and GLUT2 at the protein level are due to the inhibitory effect of male sex hormones

at posttranscriptional level of gene regulation in the small intestine of the pig, whereas SGLT1 shows different molecular characteristics without gender differences in expression at the protein level. The observed distribution of transporters involved in glucose transport along the small intestine indicates that jejunum and ileum are the main site of glucose absorption in the small intestine of the pig.

Key words: glucose absorption, small intestine, Na/K-ATPase, SGLT1, GLUT2, gender differences

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 5
1.1. Svinja kao model 6
1.2. Metabolizam glukoze 9
2.3. Prijenosnici uključeni u prijenos glukoze u tankom crijevu 10
2.3.1. Natrij-kalijeva crpka (Na/K-ATPaza) 10
2.3.2. Prijenosnik glukoze ovisan o natriju 1 (SGLT1) 13
2.3.3. Prijenosnik glukoze neovisan o natriju 2 (GLUT2) 18
2.4. Apsorpcija glukoze u tankom crijevu 22
2.5. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 27
2.6. Dijabetes i inzulin 28
3. OBRAZLOŽENJE TEME 31
4. MATERIJAL I METODE 34
4.1. Pokusne životinje 35
4.2. Kemikalije, pribor i protutijela 35
4.3. Postupci sa životinjama 36
4.3.1. Kastracija 36
4.3.2. Klanje 37
4.4. Postupci s tkivima 37
4.4.1. Imunohistokemijska analiza 37
4.4.1.1. Uzorkovanje i fiksacija tkiva 37
4.4.1.2. Priprema histoloških preparata 37
4.4.1.3. Imunohistokemija 38
4.4.2. *Western*-analiza 39
4.4.2.1. Uzorkovanje i homogenizacija tkiva 39
4.4.2.2. Izdvajanje ukupnih staničnih membrana (USM) 39
4.4.2.3. Određivanje koncentracije proteina 40
4.4.2.4. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i *western*-analiza 40
4.4.3. Analiza lančanom reakcijom polimeraze 42
4.4.3.1. Uzorkovanje i izdvajanje ukupne RNK 42
4.4.3.2. Reakcija obrnutog prepisivanja 43
4.4.3.3. Lančana reakcija polimerazom 44
4.5. Prikaz i statistička obrada podataka 45
5. REZULTATI 46

5.1. Određivanje optimalnih uvjeta za upotrebu protutijela razvijenih protiv Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu svinje 47
5.1.1. Protutijelo protiv Na/K-ATPaze 47
5.1.2. Protutijelo protiv SGLT1 49
5.1.3. Protutijelo protiv GLUT2 51
5.2. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu svinje 53
5.2.1. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na proteinskoj razini 53
5.2.2. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na proteinskoj razini 58
5.2.3. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na proteinskoj razini 63
5.2.4. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK 67
5.2.5. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na razini mRNK 69
5.2.6. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na razini mRNK 72
5.3. Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 duž tankog crijeva svinje 74
5.3.1. Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze 74
5.3.2. Raspodjela izraženosti SGLT1 77
5.3.3. Raspodjela izraženosti GLUT2 80
6. RASPRAVA 83
6.1. Utjecaj spola na izraženost Na/K-ATPaze u tankom crijevu svinje 84
6.2. Utjecaj spola na izraženost SGLT1 u tankom crijevu svinje 85
6.3. Utjecaj spola na izraženost GLUT2 u tankom crijevu svinje 86
6.4. Raspodjela prijenosnika glukoze duž tankog crijeva svinje 87
7. ZAKLJUČCI 90
8. POPIS LITERATURE 94
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA 115

POPIS OZNAKA, KRATICA I KEMIJSKIH SPOJEVA

cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*)
deH_2O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, unutarnji standard ekspresije glasničke RNK (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
GLUT2	prijenosnik glukoze neovisan o natriju 2 (engl. *glucose transporter 2*)
IgG	imunoglobulin G
Na/K-ATPaza	natrij-kalijeva crpka
pb	parovi baza (engl. *base pair*, bp)
PBS	puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *phosphate buffered saline*)
PCR	lančana rekacija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
PKC	protein-kinaza C (engl. *protein kinase C*)
PVDF	poliviniliden-difluorid
RNK	ribonukleinska kiselina
SGLT1	prijenosnik glukoze ovisan o natriju 1 (engl. *sodium-glucose cotransporter 1*)
USM	ukupne stanične membrane

1. UVOD

Tanko crijevo (lat. i*ntestinum tenue*) dio je probavne cijevi, podijeljeno na dužinom i građom tri nejednaka dijela: duodenum, jejunum i ileum. U tankom se crijevu dovršava enzimska razgradnja unesene hrane, a najveći opseg apsorpcije hranjivih tvari, vode i elektrolita u probavnoj cijevi zabilježen je upravo u duodenumu i proksimalnom dijelu jejunuma. Zbog svoje primarne uloge, apsorpcije hranjivih tvari, sluznica tankog crijeva bogato je naborana što višestruko povećava njegovu luminalnu površinu s ciljem povećanja apsorptivnog kapaciteta. Luminalna, odnosno apsorptivna površina crijeva povećana je kod ljudi i do 600 puta prisutnošću: Kerckringovih nabora sluznice tankog crijeva (~3x povećanje), crijevnih resica (~10x povećanje) i mikrovila (~20x povećanje) u usporedbi s površinom jednostavne cilindrične cijevi iste dužine. Sluznica probavnog sustava uz mjesto apsorpcije predstavlja i prvu prepreku ulasku i korisnih i štetnih tvari u organizam, odnosno u cirkulaciju. Crijevna se barijera sastoji od epitelnih stanica koje naliježu na tanki sloj rahlog vezivnog tkiva (lamina proprija, lat. *lamina propria*) u kojemu se nalaze limfne i krvne kapilare. Apsorpcija tvari iz lumena probavnog kanala uglavnom podrazumijeva transepitelni prijenos, tj. prijenos kroz epitelnu stanicu, zatim kroz laminu propriju te endotel, odnosno stijenku limfne ili krvne kapilare. Sama sluznica apsorptivnog dijela probavnog kanala građena je od više vrsta stanica. Najzastupljenije su među njima visoko prizmatične epitelne stanice, posložene u jednom sloju na sluznici crijeva, enterociti, preko kojih se odvijaju procesi apsorpcije tvari u probavnoj cijevi. Na vršnom, luminalnom, dijelu enterocita nalaze se mnogobrojni mikrovili koji vršnoj staničnoj membrani daju četkasti izgled te se stoga nazivaju i četkasta membrana (engl. *brush border membrane*). Apsorpcija vode, hranjivih tvari, pa čak i ksenobiotika odvija se prolaskom tvari kroz stanice, transcelularnim putem, bilo pasivnom difuzijom, olakšanom difuzijom, aktivnim prijenosom, pinocitozom bilo pak prolaskom tvari između stanica, odnosno paracelularnim putem (CASPARY, 1992; DESESSO i JACOBSON, 2001).

Ugljikohidrati, u obliku monosaharida, oligosaharida i pogotovo polisaharida, s više od 50 % dnevnog unosa kalorija, čine najveći količinski i energetski udio hranjivih tvari u prehrani ljudi (CASPARY, 1992). Smatra se da ljudi zapadnjačkim načinom prehrane dnevno unesu oko 1 mol glukoze, što je otprilike 180 g glukoze, koja se apsorbira zajedno s približno 46 g natrija u tankim crijevima (WRIGHT i sur., 2007). Polisaharidi i oligosaharidi se prije apsorpcije u tankom crijevu moraju prvo razgraditi na monosaharide uz pomoć probavnih enzima. Enzimska probava škroba, najzastupljenijeg polisaharida u prehrani ljudi, ali i hranidbi svinja, započinje već u usnoj šupljini pod djelovanjem slinske amilaze, nastavlja se u najvećoj mjeri u tankom crijevu pod djelovanjem gušteračine amilaze, da bi završila na četkastoj membrani enterocita u

tankom crijevu djelovanjem disaharidaza. Konačni proizvod razgradnje polisaharida i oligosaharida jesu monosaharidi – galaktoza, fruktoza i, u najvećoj mjeri, glukoza, koji mogu biti apsorbirani od strane enterocita bilo aktivnim prijenosom bilo olakšanom difuzijom. Glukoza je glavni izvor energije i važan metabolički supstrat za sintezu proteina i lipida u stanicama sisavaca. Razgradnjom glukoze procesom glikolize i ciklusa limunske kiseline oslobađa se energija u obliku adenozin-trifosfata (ATP). Glukoza se kao supstrat koristi u sintezi glicerola za proizvodnju triglicerida i neesencijalnih masnih kiselina. Velike količine glukoze utroše se u mliječnoj žlijezdi na proizvodnju laktoze tijekom laktacije (WOOD i TRAYHURN, 2003; WRIGHT i sur., 2003; ZHAO i KEATING, 2007).

S obzirom na to da je glukoza hidrofilna, za prijenos preko stanične membrane potrebni su joj specifični integrirani transmembranski proteini, tj. prijenosnici glukoze. Prijenos glukoze kroz enterocite odvija se u dva koraka – ulazak glukoze u enterocit preko četkaste membrane i izlazak glukoze van iz enterocita na bazolateralanoj membrani (MIYAMOTO i sur., 1992).

Stanična membrana skoro svih stanica posjeduje barem jedan prijenosnik za glukozu koji omogućuje ili ulazak ili izlazak glukoze iz stanice. S obzirom na to da se koncentracija glukoze kod sisavaca održava homeostatskim mehanizmima unutar uskog raspona, većina stanica uzima glukozu iz izvanstanične tekućine olakšanom difuzijom kroz staničnu membranu niz koncentracijski gradijent. Jedino epitelne stanice tankog crijeva i proksimalnih zavijenih kanalića bubrega apsorbiraju ili reapsorbiraju glukozu suprotno elektrokemijskom gradijentu, putem sekundarno aktivnog prijenosnog mehanizma koji se koristi koncentracijskim gradijentom natrijevih iona koji se održava pomoću natrij-kalijeve crpke (engl. *sodium-potassium pump, Na/K-ATPase*, Na/K-ATPaza, EC 3.6.3.9) (ZHAO i KEATING, 2007).

Članovi dviju genskih porodica staničnih prijenosnika (engl. *solute carrier transporters*, SLC) odgovorni su za prijenos monosaharida kroz stanične membrane svih stanica u tijelu, pa tako i apsorpciju glukoze u tankom crijevu, reapsorpciju glukoze iz glomerularnog filtrata te prijenos kroz barijeru krv – mozak. Prijenos glukoze kroz staničnu membranu u tankom crijevu odvija se pomoću prijenosnika glukoze ovisnog o natriju 1 (engl. *sodium-glucose cotransporter 1*, SGLT1, SLC5A1) na četkastoj membrani enterocita, koji prenose glukozu čak i suprotno koncentracijskom gradijentu (WRIGHT i sur., 2011). Uz prijenos jedne molekule glukoze, SGLT1 prenesu i dva iona natrija u stanicu. Natrij, unesen zajedno s glukozom, iz stanice izbacuje Na/K-ATPaza koja je smještena na bazolateralnoj membrani enterocita. Na/K-

ATPaza, suprotno koncentracijskom gradijentu, prenosi tri iona natrija iz stanice i unosi dva iona kalija u stanicu (BREVES i sur., 2007). Ulazak glukoze u stanicu putem SGLT1 i povećanje njezine koncentracije u stanici dovodi do pokretanja pasivnog prijenosa glukoze niz koncentracijski gradijent koji prenosi glukozu van iz stanice na bazolateralnoj membrani putem prijenosnika glukoze neovisnog o natriju 2 (engl. *glucose transporter 2*, GLUT2, SLC2A2) (THORENS i MUECKLER, 2010).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Svinja kao model

U istraživanjima fiziologije probavnog sustava, metabolizma hranjivih tvari, ali i u farmakološkim istraživanjima koja proučavaju farmakokinetiku različitih ksenobiotika najčešće se koriste različite vrste i sojevi laboratorijskih glodavaca kao model za čovjeka. Unatoč tome što se uvjeti primjene i unosa te sam oblik pojedinih tvari pokušavaju što više približiti uvjetima kod čovjeka, rezultati takvih istraživanja često budu različiti kod čovjeka i kod pokusnih životinja. U slučaju hrane, peroralne i rektalne primjene ksenobiotika prve razlike o kojima se mora voditi računa su u makroskopskoj građi i funkciji probavnog sustava, dok je na mikroskopskoj razini probavni sustav čovjeka sličan probavnom sustavu najčešće korištenih pokusnih životinja. Upravo je ta razlika u anatomiji i fiziologiji probavnog sustava čimbenik koji najviše utječe na različite ishode istraživanja, poglavito u istraživanjima apsorpcije tvari. Kako je gastroenteralni način aplikacije lijekova jedan od najčešće korištenih u svakodnevnoj praksi, a sam probavni sustav pokazuje velike razlike u morfologiji i fiziologiji između vrsta, nastala je potreba za pronalaženjem novih životinjskih modela za istraživanje (DESESSO i JACOBSON, 2001).

Još uvijek najčešće korištena pokusna životinja u istraživanjima apsorpcije tvari jest štakor. Zbog očite razlike u veličini između štakora i čovjeka, apsolutne dužine i površine pojedinih dijelova crijeva nisu usporedive. No, anatomske su razlike vidljive iz relativnih dužina i odnosa pojedinih dijelova crijeva. Tanko crijevo štakora čini 83 % ukupne dužine crijeva, dok 90 % od ukupne dužine tankog crijeva otpada na jejunum. Za razliku od štakora, tanko crijevo čovjeka čini 81 % ukupne dužine crijeva, a samo 38 % ukupne dužine tankog crijeva čini jejunum. Dokazano je da je relativna apsorptivna površina tankog crijeva, odnosno apsolutna površina crijeva normalizirana na površinu tijela, čak četiri puta veća u čovjeka nego u štakora zbog prisutnosti Kerckringovih nabora sluznice kojih u štakora nema. Na slijepo crijevo štakora otpada otprilike 26 % ukupne dužine debelog crijeva, dok slijepo crijevo kod ljudi zauzima samo 5 % ukupne dužine debelog crijeva. Ova razlika u dužini slijepog crijeva upućuje na činjenicu da fermentacija pomoću mikroorganizama, koja se odvija u slijepom crijevu, ima važniju ulogu u čitavom procesu probave kod štakora nego kod čovjeka. Zbog izostanka važnije uloge fermentacije u probavi, ljudi su, kao i svinje, u većoj mjeri ovisni o kvaliteti prehrane s obzirom da simbiotski mikroorganizmi iz probavnog sustava imaju malu ulogu u samoj probavi hranjivih tvari (DESESSO i JACOBSON, 2001).

Svinje (lat. s*us scrofa domestica*) se često koriste u biomedicinskim istraživanjima i postale su standardni opći model za kirurgiju i pretklinička istraživanja. Svinja i čovjek imaju sličnu morfologiju i fiziologiju mokraćnog sustava, krvožilnog sustava, kože te građu oka, ali i anatomiju i fiziologiju probavnog sustava Najčešća upotreba svinja kao modela je u kardiokirurgiji te u istraživanjima dijabetesa i metaboličkog sindroma. Kao svejedi, svinja i čovjek imaju, fiziološki gledano, vrlo sličan probavni sustav. No, anatomski gledano, probavni sustav svinje pokazuje neke specifičnosti koje se ne nalaze kod čovjeka poput slijepog izvrtka u želucu (lat. *diverticulum ventriculi*), dužeg debelog crijeva i grananja mezenterijskih arterija. Upotreba svinja kao modela u istraživanjima ima tendenciju rasta i smatra se da bi mogla postati model prvog izbora (MILLER i ULLREY, 1987; SWINDLE i SMITH, 2008).

Embrionalni, fetalni i postnatalni razvoj probavnog sustava čine rast, ukupne mase tkiva te veličine i broja stanica, ali i sazrijevanje promjenom strukture i funkcije tkiva. Embrionalni razvoj i stupanj zrelosti probavnog sustava uoči rođenja kod čovjeka sličniji su prekocijalnim vrstama, odnosno vrstama koje imaju dulju gravidnost te se stoga rađaju sa zrelijim probavnim sustavom poput svinje, nego altricijalnim vrstama s relativno kratkom gravidnošću i nezrelim probavnim sustavom prilikom rođenja poput miša ili štakora. Iako se aktivnost pojedinih prijenosnika za hranjive tvari bilježi već u fetalnom razvoju, postoje razlike u razdoblju pojave, ali i u izraženosti pojedinih prijenosnika za hranjive tvari. Kod prekocijalnih vrsta, pa tako i čovjeka, prijenosnici se ranije aktiviraju i tako omogućuju fetusu da apsorbira ugljikohidrate, aminokiseline i proteine iz progutane amnionske tekućine (PÁCHA, 2000; GUILLOTEAU i sur., 2010; KRSTANOVIĆ i sur., 2013).

Aktivan prijenos hranjivih tvari u tankom crijevu kod svinja i čovjeka pojavljuje se relativno rano tijekom fetalnog razdoblja, zajedno s diferencijacijom enterocita. Prijenos tvari se tijekom intrauterinog razvoja odvija čitavom dužinom crijevne resice, dok se prijenos tvari u zrelim crijevima pomiče prema vrhu crijevne resice (GUILLOTEAU i sur., 2010). Aktivnost disaharidaza u četkastim membranama i aktivan prijenos glukoze u enterocitima pojavljuju se u embrionalnom tankom crijevu čovjeka između 10. i 11. tjedna trudnoće, odnosno kada je proteklo 25 % trudnoće (LINDBERG, 1966; LEVIN i sur., 1968), dok se gradijent apsorpcije glukoze od duodenuma prema ileumu uspostavlja već između 17. (40 % trudnoće) i 30. (75 % trudnoće) tjedna trudnoće (MALO i BERTELOOT, 1987). BUDDINGTON i MALO (1996) dolaze do sličnog zaključka u svom istraživanju o aktivnosti prijenosnika glukoze u fetalnom tankom crijevu svinje, kojim su ustanovili da je aktivnost laktaze, jedna od disaharidaza, i

prijenosnika glukoze prisutna već u 7. tjednu gravidnosti (43 % gravidnosti) s vrhuncem razvoja aktivnosti prijenosnika u 10. tjednu gravidnosti (61 % gravidnosti), te da je gradijent apsorpcije glukoze od duodenuma do ileuma uspostavljen s 12. tjednom gravidnosti (74 % gravidnosti). Aktivnost laktaze kod prasadi ostaje stabilna prvih 10 dana *post partum*, da bi nakon toga njezina aktivnost počela opadati. U tom je razdoblju uočena aktivnost invertaze i maltaze, koje postaju dominantne disaharidaze u tankom crijevu svinje (SMITH, 1988).

Među svim sisavcima koji nisu primati, ljudima najsličnije potrebe za hranjivim tvarima imaju svinje. Slične potrebe za hranjivim tvarima proizlaze iz sličnosti koju čovjek i svinja imaju u fiziologiji probave i povezanih metaboličkih procesa temeljenih na prehrani svojstvenoj svejedima, relativnoj dužini crijeva u odnosu na tjelesnu masu, vremenu prolaska konzumirane hrane kroz probavni sustav te morfologiji crijevnih resica, što upravo svinju čini modelom prvog izbora za proučavanje fiziologije probavnog sustava ljudi, pogotovo u istraživanjima apsorpcije i biodostupnosti hranjivih tvari (POND i HOUPT, 1978; PATTERSON i sur., 2008; GUILLOTEAU i sur., 2010; HELKE i SWINDLE, 2013).

Uloga svinje kao modela u istraživanjima mogla bi dobiti još veće značenje, pogotovo otkad je i pravnim aktima u određenim istraživanjima preporučeno testiranje na najmanje dvije vrste sisavaca, od kojih jedna ne bi trebala biti iz roda glodavaca, prije stavljanja nekog lijeka na tržište (SABOLIĆ i sur., 2011; HELKE i SWINDLE, 2013).

Važnost uvođenja novih vrsta pokusnih životinja kao modela za čovjeka vidljiva je u istraživanjima izraženosti različitih membranskih prijenosnika za endogene, nastale u fiziološkim uvjetima tijekom metabolizma, i egzogene, unesene hranom, zrakom ili uporabom ksenobiotika, organske anione (engl. *organic anion transporter*, OAT) i organske katione (engl. *organic cation transporter*, OCT). Mnogi od tih prijenosnika pokazuju značajne spolne razlike u izraženosti kod laboratorijskih glodavaca, dok kod ljudi nisu zamijećene spolne razlike u izraženosti. Uočeno je da OAT1 ima jaču izraženost u bubrezima mužjaka štakora i miševa, dok su OAT2 i OAT5 jače izraženi u bubrezima ženki. Prijenosnici iz porodice OAT ne pokazuju spolne razlike u izraženosti kod ljudi. Prijenosnik OCT2 pokazuje značajne spolne razlike u izraženosti u bubrezima štakora i miševa (mužjaci > ženki), dok izraženost OCT1 pokazuje spolne razlike samo u štakora (mužjaci < ženke). Spolne razlike u izraženosti OCT1 i OCT2 u bubrezima ljudi nisu uočene (SABOLIĆ i sur.; LJUBOJEVIĆ i sur., 2007; URAKAMI i sur., 2000).

2.2. Metabolizam glukoze

Količina glukoze u tkivima uglavnom ovisi o dostupnosti, probavi i apsorpciji ugljikohidrata u tankom crijevu. Ugljikohidrati, najčešće u obliku škroba, probavljaju se pomoću slinske i gušteračine amilaze i disaharidaza iz četkaste membrane enterocita do glukoze, galaktoze i fruktoze (ZHAO i KEATING, 2007). Potreba za glukozom se, osim apsorpcijom iz probavljene hrane, upotpunjuje i *de novo* sintezom glukoze iz supstrata koji po sastavu nisu ugljikohidrati, tj. glukoneogenezom, u jetrima i bubrezima. Nakon apsorpcije u tankom crijevu, veliki dio fruktoze i gotova sva galaktoza u jetrima se pretvaraju u glukozu i otpuštaju natrag u cirkulaciju. Pretpostavlja se da čak 95 % svih monosaharida što se nalaze u cirkulaciji čini glukoza (GUYTON i HALL, 2006).

Apsorbirana glukoza u stanicama se može odmah upotrijebiti za oslobođenje energije ili se može pohraniti u obliku polisaharida glukoze, glikogena. Glikogen kao dodatan izvor glukoze u tijelu u najvećim se količinama može naći u jetrima (čak 5 – 8 % stanične mase) i mišićima (1 – 3 % stanične mase) (GUYTON i HALL, 2006). Razgradnjom glikogena u jetrima – glikogenolizom, glukoza može ići izravno u cirkulaciju i biti iskorištena svugdje u tijelu. No, glukoza dobivena iz mišićnog glikogena ne može ići direktno u cirkulaciju, nego se u mišićima izravno oksidira do piruvata iz kojega nastaje mliječna kiselina koja cirkulacijom odlazi do jetara gdje je pak jedan od supstrata za proces glukoneogeneze (ASCHENBACH i sur., 2009).

Ako se stanice, ponajprije jetrene stanice, gotovo zasite glikogenom, višak glukoze se u jetrima i masnom tkivu pretvara u trigliceride i pohranjuje u masnim stanicama. Prilikom sinteze triglicerida iz monosaharida prvi je korak pretvorba monosaharida u acetil-koenzim A (acetil-CoA), što se događa tijekom glikolize, iz kojega kasnije nastaju masne kiseline koje se nakon polimerizacije spajaju s molekulom glicerola i tako tvore trigliceride (GUYTON i HALL, 2006).

U fiziološkim uvjetima sva glukoza iz cirkulacije biva filtrirana u glomerulima bubrega. Kako glomerularna filtracija nije selektivna, tj. skoro se sve otopljene tvari u plazmi filtriraju osim plazmatskih proteina i tvari vezanih za njih, tubularna reapsorpcija pokazuje visoku selektivnost. Glukoza se skoro u potpunosti reapsorbira u bubrežnim proksimalnim kanalićima putem SGLT1 i prijenosnika glukoze ovisnog o natriju 2 (engl. *sodium-glucose cotransporter 2*, SGLT2, SLC5A2) te je stoga ekskrecija glukoze putem mokraće zanemariva. Reapsorpcijom

glukoze pomoću sekundarno aktivnih prijenosnika SGLT1 i SGLT2 ne troši se izravno ATP, već ona ovisi o potrošenoj energiji primarno aktivne Na/K-ATPaze na bazolateralnoj membrani. Djelovanjem Na/K-ATPaze održava se gradijent za olakšanu difuziju iona natrija kroz luminalnu membranu epitelne stanice proksimalnih kanalića koji istodobno prenose glukozu suprotno elektrokemijskom gradijentu. Na bazolateralnoj membrani epitelnih stanica proksimalnih kanalića, glukoza olakšanom difuzijom prelazi u međustaničnu tekućinu. Ako njezina koncentracija u glomerularnom filtratu premašuje kapacitet prijenosnika SGLT1 i SGLT2, ona će se izlučivati mokraćom. Kako je koncentracija glukoze u glomerularnom filtratu usko povezana s njezinom koncentracijom u krvi, prevelika koncentracija u krvi dovodi do izlučivanja viška putem mokraće, što se često uočava kod šećerne bolesti (GUYTON i HALL, 2006).

2.3. Prijenosnici uključeni u prijenos glukoze u tankom crijevu

2.3.1. Natrij-kalijeva crpka (Na/K-ATPaza)

Iako se već ranije pretpostavljalo da na staničnim membranama postoje prijenosnici za ione natrija, SKOU (1957) je bio prvi koji je predložio postojanje zajedničkog prijenosa natrijevih i kalijevih iona uz utrošak energije u obliku ATP-a. Prijenos iona natrija kroz enterocit odvija se izmjenjivačem iona natrija i vodika (engl. *sodium-hydrogen exchanger 3*, NHE3, SLC9A3) ili zajedničkim prijenosom s drugim tvarima, najčešće glukozom ili aminokiselinama, kroz četkastu membranu, i aktivnim prijenosom suprotno koncentracijskom gradijentu na bazolateralnoj membrani van iz stanice putem Na/K-ATPaze (COON i sur., 2011; ROCAFULL i sur., 2012).

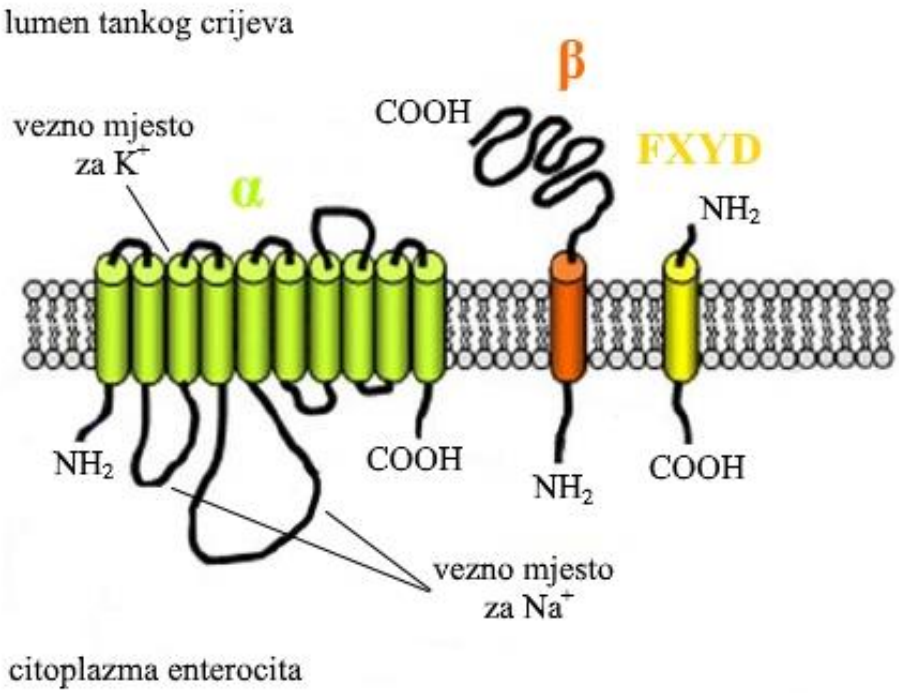
Sve eukariotske životinjske stanice imaju visoku izvanstaničnu koncentraciju iona natrija i visoku unutarstaničnu koncentraciju kalijevih iona. Na/K-ATPaza je visoko konzerviran transmembranski enzim iznimno važan za održavanje stanične homeostaze. Taj je enzim odgovoran za održavanje niske unutarstanične koncentracije iona natrija i visoke koncentracije kalijevih iona, što je iznimno važno za održavanje staničnog membranskog potencijala i elektrokemijskog gradijenta za prijenos metabolita i hranjivih tvari preko stanične membrane. Na/K-ATPaza je ujedno i jedini put kod sisavaca kojim se u fiziološkim uvjetima

ioni natrija prenose iz stanice van. Održavanje staničnog membranskog potencijala iznimno je važno u podražljivim stanicama poput mišićnih i živčanih stanica. Osim održavanja membranskog potencijala, Na/K-ATPaza je važna i za održavanje staničnog volumena i osmotskog tlaka unutar stanice te posredno pH-vrijednosti citoplazme i razine kalcijevih iona. Na/K-ATPaza za svoj rad treba energiju u obliku citosolnog ATP-a. Hidrolizom jedne molekule ATP-a oslobađa se energija dovoljna za prijenos tri iona natrija van iz stanice i dva iona kalija u stanicu (ROSE i VALDES, 1994; EWART i KLIP, 1995; THERIEN i BLOSTEIN, 2000; YU, 2003). Zbog svoje iznimne važnosti Na/K-ATPaza se može naći u skoro svim stanicama sisavaca. No, ovisno o samoj metaboličkoj aktivnosti stanice, izraženost Na/K-ATPaze na membranama varira. Tako je uočeno da je izraženost Na/K-ATPaze čak 160 000 puta veća u živčanim stanicama nego na membranama eritrocita (KÖKSOY, 2002).

Smatra se da je čak 95 % ukupne stanične Na/K-ATPaze smješteno na bazolateralnim membranama (MIRCHEFF i WRIGHT, 1976). Iako se u literaturi uglavnom navodi da je smještaj Na/K-ATPaze u stanicama na bazolateralnim membranama, zapravo se primarno nalazi na lateralnim membranama enterocita. Takav smještaj Na/K-ATPaze odgovara današnjim spoznajama o prijenosu iona i vode u enterocitima. Čvrste međustanične veze (engl. *tight junction*) između enterocita te posljedično onemogućen paracelularni prijenos otopljenih tvari i vode dovodi do povećanja osmotskog tlaka u vršnom dijelu međustaničnog prostora. Natrijevi ioni izlaze u međustanične prostore zbog smještaja Na/K-ATPaze na lateralnim membranama te se zato povećava osmotski tlak u međustaničnim prostorima zbog sporog prolaska iona kroz međustanični prostor prema lamini propriji. Upravo to povećanje osmotskog tlaka u međustaničnom prostoru sa sobom povlači vodu iz enterocita koja smanjuje osmotski tlak u međustaničnim prostorima stvarajući izotoničnu otopinu tvari koja ulazi u laminu propriju crijevne resice (AMERONGEN i sur., 1989; WRIGHT i LOO, 2000).

U svom najjednostavnijem obliku Na/K-ATPaza se sastoji od 110 kDa katalitičke α, 55 kDa glikoproteinske β-podjedinice i FXYD proteina (slika 1). Katalitička α-podjedinica jest integrirani membranski protein koji dolazi u četiri izoforme (α1-α4), a prolazi kroz staničnu membranu 6 – 10 puta i sadržava vezna mjesta za ione natrija, kalija, magnezija i ATP. Podjedinica α ujedno je i jedino poznato vezno mjesto za srčane glikozide, ouabain i digoksin, koji se koriste u liječenju aritmija i kongestivnog zatajenja srca. Izoforma α1 nalazi se u gotovo svim stanicama s najvećom izraženosti u bubrezima. Izoforma α2 najviše je zastupljena u poprečnoprugastom mišiću, mozgu i srcu, dok je izoforma α3 najviše izražena u mozgu.

Glikoproteinska β-podjedinica ima samo jedan transmembranski dio, dok se najveći glikozilirani dio nalazi izvanstanično i dolazi u četiri izoforme (β1 – β4). Izoforma β1 najzastupljenija je u bubrezima, dok je β2 izolirana samo iz mozga. O izoformama β3 i β4 još se uvijek ne zna mnogo. FXYD proteini su mali membranski proteini s jednim transmembranskim dijelom, koji mogu mijenjati afinitet Na/K-ATPaze prema natrijevim i kalijevim ionima (HARMS i WRIGHT, 1980; SKOU i ESMANN, 1992; EWART i KLIP, 1995; YU, 2003; GEERING, 2008). U tankom crijevu sisavaca izražene su samo α1 i β1-podjedinica (WILD i sur., 1999).



Slika 1. Struktura Na/K-ATPaze. Na/K-ATPaza iz tankog crijeva sastoji se od α1 i β1-podjedinice te proteina FXYD. α1-podjedinica ima 10 transmembranskih domena. Vezno mjesto za kalijeve ione na izvanstaničnoj strani membrane nalazi se između 2. i 3. transmembranske domene α1-podjedinice. Vezna mjesta za natrijeve ione nalaze se na 2. i 3. unutarstaničnoj petlji α1-podjedinice. β1-podjedinica ima jednu transmembransku domenu i dugački glikozilirani izvanstanični dio. Protein FXYD također se sastoji samo od jedne transmembranske domene. Preuzeto i prilagođeno od: RAJASEKARAN I RAJASEKARAN (2009).

Izraženost Na/K-ATPaze se na staničnoj razini regulira opsegom sinteze pojedinih podjedinica i njihovom ugradnjom u staničnu membranu. Okolišni i hormonski čimbenici mogu utjecati na izraženost Na/K-ATPaze, bilo utjecajem na samu aktivnosti prijenosnika, povećanjem izražaja prijenosnika na staničnoj membrani iz rezervi u citoplazmi ili povećanjem sinteze prijenosnika, bilo na razini prepisivanja gena na mRNK, transkripciji, bilo prevođenjem kodona s mRNK u aminokiseline, translaciji (KÖKSOY, 2002). Dokazano je da glukokortikoidi i mineralokortikoidi povećavaju aktivnost Na/K-ATPaze (CHARNEY i sur., 1975). Aktivnost Na/K-ATPaze i izraženost na proteinskoj razini veća je u jejunumu štakora nego u ileumu, dok je izraženost na razini mRNK jača, iako ne značajno, u ileumu. Ova razlika u izraženosti između proteinske i mRNK razine Na/K-ATPaze upućuje na postojanje posttranskripcijskih mehanizama koji utječu na izraženost gena za Na/K-ATPazu (WILD i sur., 1999).

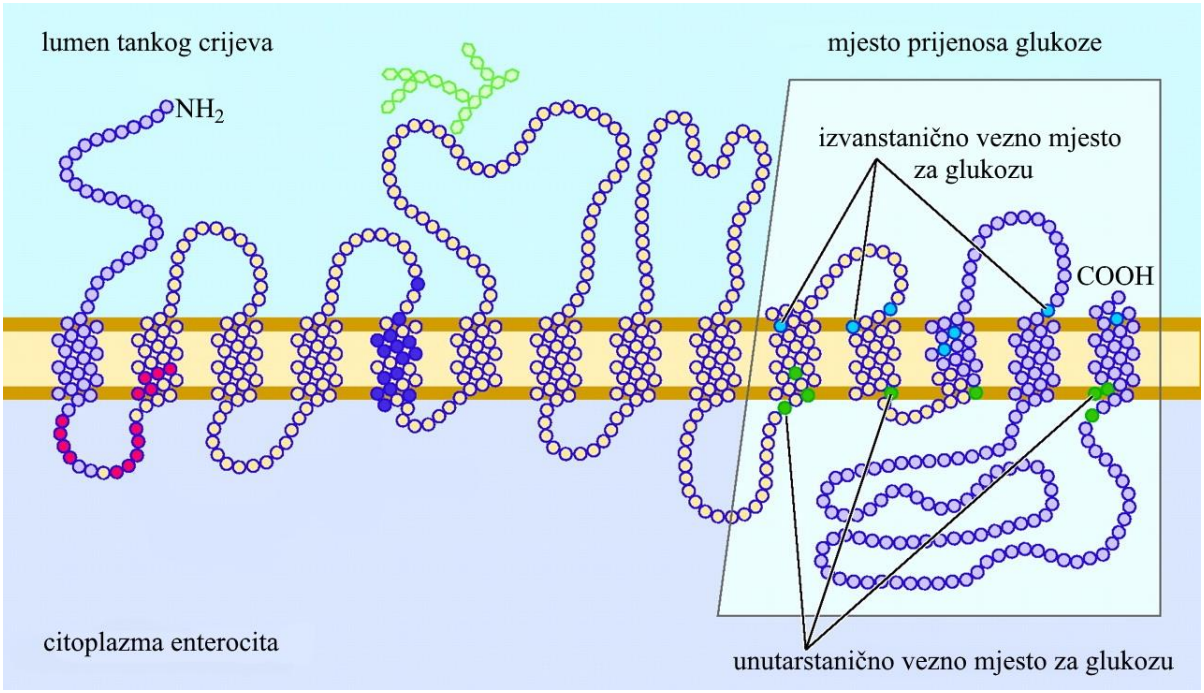
Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze duž crijevne resice upućuje na jaču izraženost u vršnoj polovici resice gdje se nalaze zreli enterociti (ROWLING i SEPULVEDA, 1984; WILD i MURRAY, 1992).

2.3.2. Prijenosnik glukoze ovisan o natriju 1 (SGLT1)

Crane je još šezdesetih godina prošlog stoljeća uočio da prijenos glukoze u tankim crijevima ide zajedno s natrijevim ionima (CRANE, 1960), da bi prvi prijenosnik glukoze ovisan o natriju, SGLT1, bio identificiran tek dvadesetak godina kasnije u jejunumu kunića (PEERCE i WRIGHT, 1984). Wright i njegov tim su 1987. godine bili prvi koji su uspjeli izolirati cDNK koja kodira SGLT1 u tankom crijevu kunića (HEDIGER i sur., 1987), a dvije godine poslije uspjeli su izolirati cDNK i kod ljudi (HEDIGER i sur., 1989).

Prva istraživanja koja su uključivala prijenosnike glukoze u tankom crijevu svinja bavila su se kinetikom prijenosa glukoze kroz membranu enterocita, koristeći vezikule staničnih membrana kojima se uspjelo dokazati da postoje dvije vrste prijenosnika za glukozu – prijenosnik s visokim afinitetom i niskim kapacitetom te prijenosnik s niskim afinitetom i visokim kapacitetom (KELJO i sur., 1985; HALAIHEL i sur., 1999). SGLT1, membranski protein od 73 kDa (slika 2), glavni je prijenosnik glukoze i galaktoze iz lumena crijeva u

enterocit s visokim i jednakim afinitetom za glukozu i galaktozu (K_m ~0,4 mM), ali zato malim kapacitetom za prijenos (ZHAO i KEATING, 2007; WRIGHT i sur., 2011).



Slika 2. Struktura SGLT1. SGLT1 ima 14 transmembranskih domena s N i C-terminalnim krajevima usmjerenim izvan stanice. Mjesto vezanja glukoze na SGLT1 nalazi se na C-terminalnom kraju. Preuzeto i prilagođeno od: WRIGHT i sur. (2004).

Genska porodica SLC5 kod ljudi ima 11 članova, od kojih se za devet članova zna koja im je funkcija, a šest od njih su prijenosnici. Uloga prijenosnika glukoze ovisnog o natriju 4 (engl. *sodium-glucose cotransporter 4*, SGLT4, SLC5A8), nađenog ponajprije u tankim crijevima, i prijenosnika glukoze ovisnog o natriju 5 (engl. *sodium-glucose cotransporter 5*, SGLT5, SLC5A9), nađenog isključivo u bubrezima, dosad nije poznata. SGLT1 (SLC5A1) primarno se nalazi na četkastoj membrani zrelih enterocita i u S3 segmentu proksimalnih kanalića bubrega. SGLT2 je izražen jedino u kori bubrega na četkastim membranama S1 i S2 segmenta proksimalnih kanalića bubrega gdje reapsorbira glukozu, čak i do 180 g dnevno kod čovjeka, iz glomerularnog filtrata. Specifični inhibitor aktivnosti SGLT1 i SGLT2 jest glukozid iz kore drveta jabuke, florizin. Prijenosnik glukoze ovisan o natriju 3 (engl. *sodium-glucose cotransporter 3*, SGLT3, SLC5A4) jest prijenosnik glukoze s izrazito malim afinitetom za glukozu te je njegova uloga kao prijenosnika zanemariva, a može se naći u tankim crijevima, bubrezima i mišiću. Smatra se da SGLT3 ima ulogu senzora za glukozu. Prijenosnik glukoze ovisan o natriju 6 (engl. *sodium-glucose cotransporter 6*, SGLT6, SLC5A10) široko je rasprostranjen prijenosnik s niskim afinitetom za glukozu i mioinozitol, prekursor za sintezu fosfolipida koji sadržavaju inozitol. SMIT1 (engl. *sodium/myo-inositol transporter*, SLC5A3) prijenosnik je natrijevih iona i mioinozitola i može se naći u mozgu, srcu, bubrezima i plućima. NIS (engl. *sodium/iodide symporter*, SLC5A5) jest prijenosnik natrijevih iona i joda koji se nalazi na bazalnim membranama u štitnoj žlijezdi, dok se AIT (engl. *apical iodide transporter*, SLC5A11), prijenosnik za jod, nalazi na vršnim membranama. SMVT (engl. *sodium-dependent multivitamin transporter*, SLC5A6) široko je rasprostranjen prijenosnik natrijevih iona i vitamina poput biotina (vitamin B_7) i pantotenske kiseline (vitamin B_5). CHT (engl. *choline transporter*, SLC5A7) jest prijenosnik u središnjem živčanom sustavu gdje prenosi kolin kroz membrane živčanih stanica u kojima se iz kolina sintetizira neurotransmiter acetilkolin (SCHEEPERS i sur., 2004; WRIGHT i sur., 2007; BALEN i sur., 2008; SABOLIĆ i sur., 2012; BALON, 2012; AUGUSTIN i MAYOUX, 2014).

SGLT1 ima vezno mjesto i za glukozu i za natrijeve ione, a koncentracijski gradijent natrija je sila koja pokreće prijenos glukoze putem SGLT1. Naime, koncentracija natrijevih iona manja je unutar stanice nego izvan nje, tako da dva iona natrija putuju niz koncentracijski gradijent u stanicu putem SGLT1 prenoseći sa sobom i jednu molekulu glukoze (BREVES i sur., 2007). Na izvanstanični dio slobodnog prijenosnika prvo se vežu dva iona natrija koji mijenjaju konformaciju prijenosnika i tako omogućuju vezanje glukoze, dok se nakon prijenosa kroz membranu prvo otpušta glukoza u stanicu (THORSEN i sur., 2014). Prolazak natrijevih

iona i glukoze sa sobom vodi i ulazak vode iz lumena crijeva kroz enterocit u cirkulaciju. Smatra se da svaku molekulu apsorbirane glukoze prate dva iona natrija i 249 molekula vode (WRIGHT i LOO, 2000; LOO i sur., 2002). Na/K-ATPaza, koja je smještena na bazolateralnoj membrani, održava koncentracijski gradijent natrijevih iona i tako zapravo doprinosi prijenosu glukoze, čak i suprotno koncentracijskom gradijentu, zbog porasta koncentracije glukoze u enterocitu. Inhibicija Na/K-ATPaze dovodi do inhibicije aktivnog prijenosa hranjivih tvari, pa tako i glukoze putem SGLT1 (CASPARY, 1992), ali isto tako povećana aktivnost Na/K-ATPaze dovodi do smanjenja unutarstanične koncentracije natrijevih iona što za posljedicu ima povećanje koncentracijskog gradijenta i pojačanu aktivnost prijenosa glukoze putem SGLT1 (ALEXANDER I CAREY, 2001). SGLT1 sadržava vezna mjesta za potencijalnu fosforilaciju protein-kinaze A (engl. *protein kinase* A, PKA) i protein-kinaze C (engl. *protein kinase C,* PKC), čijom se aktivacijom prijenos glukoze poveća za 30 %, odnosno 60 % (WRIGHT i sur., 1997). Izraženost SGLT1 na razini mRNK utvrđena je kod svinja u jejunumu, jetrima i bubregu (ASCHENBACH i sur., 2009).

Gradijent izraženosti SGLT1 u tankom crijevu kod čovjeka ide od najvišeg u duodenumu prema najnižoj izraženosti u ileumu (CHEN i sur., 2010). Slična je raspodjela izraženosti SGLT1 ustanovljena i u tankom crijevu štakora (CHANG WAYHS i sur., 2011) i miševa (YOSHIKAWA i sur., 2011). BALEN i sur. (2008) pak u svom istraživanju na štakorima zaključuju da je najjača izraženost SGLT1 u jejunumu, a podjednaka u ileumu i duodenumu. Kod kunića je ustanovljena najjača izraženost u jejunumu (TAKATA i sur., 1992), dok kod pasa i kokoši nije ustanovljena razlika u prijenosu glukoze putem SGLT1 po pojedinim dijelovima tankog crijeva (GARRIGA i sur., 1999; BARFULL i sur., 2002; BATCHELOR i sur., 2011). VAN DER WIELEN i sur. (2014) u svom su istraživanju o raspodjeli izraženosti SGLT1 duž tankog crijeva kod čovjeka, miša i svinje potvrdili da čovjek i miš imaju sličnu raspodjelu, odnosno najveću izraženost u duodenumu, koja opada prema ileumu, dok su najveću izraženost kod svinje ustanovili u jejunumu.

U istraživanjima na štakorima, miševima i kunićima imunohistokemijskim je metodama dokazana prisutnost SGLT1 u četkastoj membrani crijevnih resica duž čitavog tankog crijeva, s jačom izraženošću na vršnoj polovici resice, dok prisutnost u vrčastim stanicama i kriptama nije dokazana. Uočeno pozitivno bojenje Golgijeva aparata u nezrelim enterocitima koji se nalaze blizu kripti može biti posljedica sinteze SGLT1 u Golgijevu aparatu i unutarstaničnog prijenosa na vršne membrane enterocita (MEDDINGS i sur., 1990; YOSHIDA i sur., 1995).

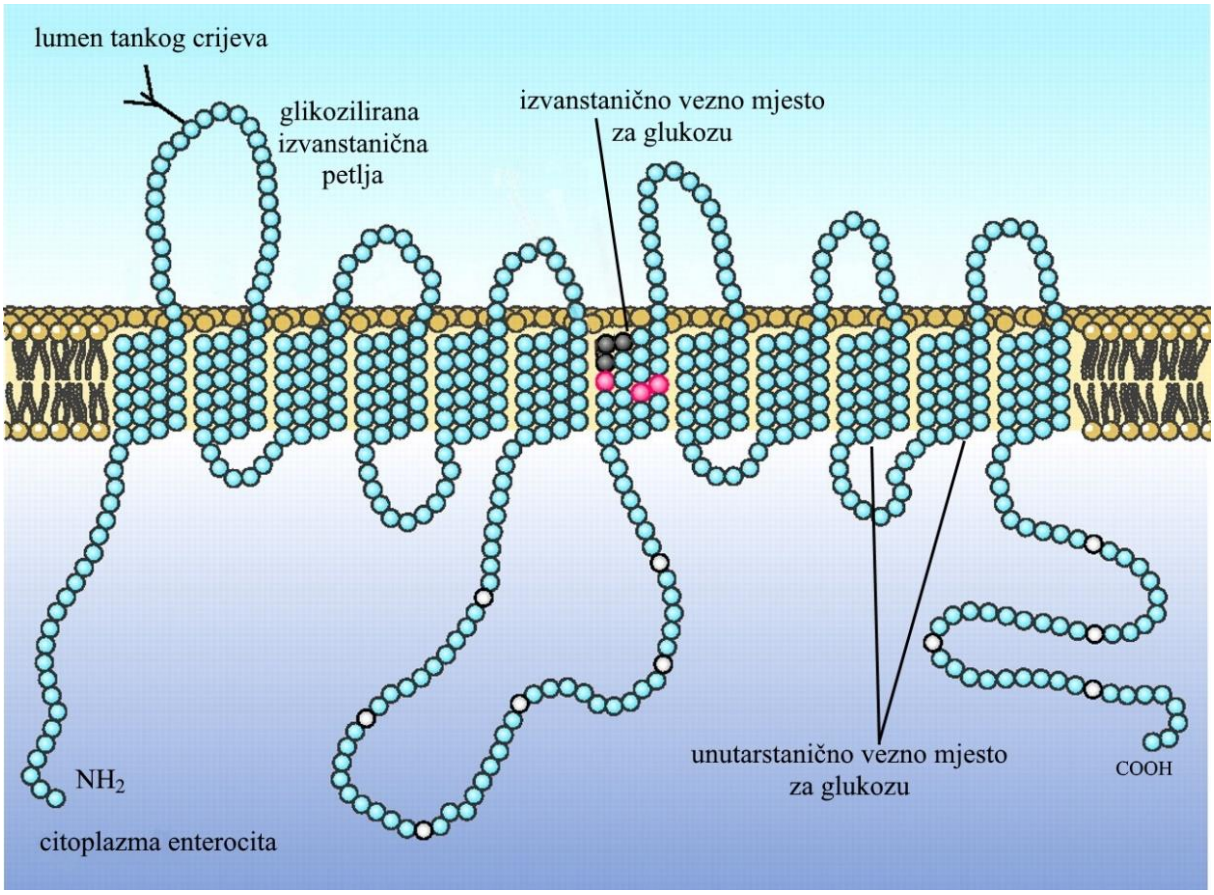
Suprotno spomenutim istraživanjima, TAKATA i sur. (1992) pak u svom istraživanju na štakorima nisu uočili razliku u izraženosti SGLT1 duž crijevne resice imunohistokemijskim metodama. Istraživanja o izraženosti mRNK za SGLT1 *in situ* hibridizacijom duž crijevne resice daju različite rezultate. Dok su jedni utvrdili višu izraženost SGLT1 na vršnoj polovici resice, što bi upućivalo na činjenicu da je izraženost SGLT1 ograničena samo na potpuno izdiferencirane enterocite koji se nalaze pri vrhu crijevne resice (HWANG i sur., 1991), drugi su pak našli jaču izraženost SGLT1 na razini mRNK na donje dvije trećine crijevne resice, bliže kriptama, objašnjavajući to činjenicom da bez obzira na to što enterocit nije zreo, gen za SGLT1 mora svejedno biti izražen (LEE i sur., 1994). Izraženost SGLT1 u tankom crijevu na proteinskoj razini u većini istraživanja ne prati izraženost i na razini mRNK, što upućuje na to da se regulacija izraženosti gena za SGLT1 događa posttranskripcijski, tj. nakon prepisivanja gena na mRNK (LESCALE-MATYS i sur., 1993; BARFULL i sur., 2002).

Količina ugljikohidrata u obroku utječe na količinu SGLT1 prijenosnika u tankim crijevima. Veća količina ugljikohidrata u hranidbi kod štakora povećala je izraženost SGLT1 na mRNK razini u takom crijevu (MIYAMOTO i sur., 1993). Pokusima na svinjama utvrđeno je da veća količina ugljikohidrata u prehrani povećava izraženost SGLT1 na proteinskoj i mRNK razini u distalnijim dijelovima tankog crijeva. Povećana izraženost na četkastoj membrani i veće područje izraženosti SGLT1 u tankom crijevu upućuju na mehanizam prilagodbe crijeva na veću količinu glukoze (MORAN i sur., 2010). Teže probavljivi ugljikohidrati, koji u svom sastavu imaju veći udio teže probavljive amiloze, također povećavaju izraženost SGLT1 na razini mRNK u ileumu svinja što upućuje na činjenicu da je koncentracija glukoze u distalnijim dijelovima tankog crijeva relativno visoka zbog sporije razgradnje ugljikohidrata te se takvi ugljikohidrati u najvećoj mjeri apsorbiraju u ileumu (WOODWARD i sur., 2012).

2.3.3. Prijenosnik glukoze neovisan o natriju 2 (GLUT2)

GLUT2 pripada porodici prijenosnika glukoze neovisnih o natriju (engl. *glucose transporter*, GLUT) koja pripada genskoj porodici SLC2 od 14 članova. Struktura GLUT2 prikazana je na slici 3. Prema filogenetskim istraživanjima sličnosti sekvencija, porodica prijenosnika glukoze neovisnih o natriju podijeljena je na tri razreda. Prvi razred uključuje prijenosnik glukoze neovisan o natriju 1 (engl. *glucose transporter 1*, GLUT1, SLC2A1), prijenosnik glukoze neovisan o natriju 2 (engl. *glucose transporter 2*, GLUT2, SLC2A2), prijenosnik glukoze neovisan o natriju 3 (engl. *glucose transporter 3*, GLUT3, SLC2A3), prijenosnik glukoze neovisan o natriju 4 (engl. *glucose transporter 4*, GLUT4, SLC2A4) i prijenosnik glukoze neovisan o natriju 14 (engl. *glucose transporter 14*, GLUT14, SLC2A14), koji su ujedno i najbolje istraženi prijenosnici glukoze neovisni o natriju. Drugi razred čine GLUT-ovi čija nomenklatura ne odgovara u potpunosti primarnom supstratu koji prenose, a čine ih prijenosnici fruktoze: prijenosnik glukoze neovisan o natriju 5 (engl. *glucose transporter 5*, GLUT5, SLC2A5), prijenosnik glukoze neovisan o natriju 7 (engl. *glucose transporter 7*, GLUT7, SLC2A7), prijenosnik glukoze neovisan o natriju 9 (engl. *glucose transporter 9*, GLUT9, SLC2A9) i prijenosnik glukoze neovisan o natriju 11(engl. *glucose transporter 11*, GLUT11, SLC2A11). Treći se razred sastoji od prijenosnika glukoze neovisnog o natriju 6 (engl. *glucose transporter 6*, GLUT6, SLC2A6), prijenosnika glukoze neovisnog o natriju 8 (engl. *glucose transporter 8*, GLUT8, SLC2A8), prijenosnika glukoze neovisnog o natriju 10 (engl. *glucose transporter 10*, GLUT10, SLC2A10), prijenosnika glukoze neovisnog o natriju 12 (engl. *glucose transporter 12*, GLUT12, SLC2A12) i prijenosnika za vodik i mioinozitol (engl. H^+*-myo-inositol transporter*, HMIT, SLC2A13). GLUT1, GLUT2 i GLUT3 jedini su prijenosnici iz porodice GLUT koji su stalno prisutni na staničnoj membrani. GLUT1 je najzastupljeniji u membranama eritrocita i endotelnim stanicama u mozgu, dok se GLUT3 nalazi u tkivima koja imaju velike potrebe za glukozom, poput središnjeg živčanog sustava i testisa. GLUT4, čiju izraženost na staničnoj membrani regulira inzulin, prenosi glukozu u stanice mišića i masnog tkiva. GLUT14 isključivo se nalazi u testisima. GLUT5 je dobro izražen na četkastoj membrani u proksimalnom dijelu tankog crijeva gdje prenosi fruktozu iz lumena u enterocit, dok njegovu ulogu u distalnijim dijelovima tankog crijeva i u debelom crijevu zamjenjuje GLUT7. GLUT9, koji osim fruktoze prenosi i mokraćnu kiselinu, u najvećoj se količini može naći u bubrezima i jetrima, dok se GLUT11 nalazi u gušterači, bubrezima i posteljici. GLUT6 je prijenosnik glukoze s niskim afinitetom koji se može naći u mozgu, slezeni i u leukocitima. GLUT8, iznimno važan za opskrbu spermija glukozom, najviše je izražen u

testisima spolno zrelih mužjaka te se pretpostavlja da je njegova izraženost regulirana spolnim hormonima. GLUT10 najviše je prisutan u jetrima i gušterači, a GLUT12 u srcu i prostati. HMIT je izražen isključivo u mozgu i ne sudjeluje u prijenosu glukoze, nego je prijenosnik mioinozitola (ZHAO i sur., 1998; JOOST i sur., 2002; LI i sur., 2004; SCHEEPERS i sur., 2004; AUGUSTIN i MAYOUX, 2014; LONG i CHEESEMAN, 2015).



Slika 3. Struktura GLUT2. GLUT2 ima 12 transmembranskih domena s N i C-terminalnim krajevima usmjerenima prema citoplazmi unutar stanice. Između 1. i 2. transmembranske domene nalazi se velika glikozilirana izvanstanična petlja. Mjesto prijenosa glukoze nalazi se bliže C-terminalnom kraju. Preuzeto i prilagođeno od: MANOLESCU i sur. (2007).

GLUT2 je prijenosnik s niskim afinitetom (K_m ~17 mM), ali zato visokim kapacitetom za prijenos glukoze. Bez obzira na navedene karakteristike, GLUT2 ima najviši afinitet za glukozu unutar porodice GLUT (BROWN, 2000). Osim glukoze, GLUT2 prenosi i fruktozu (K_m ~76 mM), galaktozu (K_m ~92 mM) i manozu (K_m ~125 mM), a najviši afinitet ima za prijenos glukozamina (K_m ~0,8 mM) (ULDRY i sur., 2002; ZHAO i KEATING, 2007).

GLUT2 se nalazi u jetrima, tankim crijevima, bubrezima, Langerhansovim otočićima u gušterači i mozgu kod štakora (THORENS i sur., 1990a, 1990b; CHEESEMAN, 1993). U bubrezima i tankim crijevima izraženost GLUT2 dokazana je na bazolateralnoj membrani stanica, gdje sudjeluje u otpuštanju apsorbirane i reapsorbirane glukoze u cirkulaciju (KELLETT i BROT-LAROCHE, 2005). U jetrenim stanicama, hepatocitima, GLUT2 zadužen je za opuštanje glukoze nastale glukoneogenezom u krv, dok u β-stanicama gušterače i hipotalamusu ima ulogu senzora za glukozu i tako utječe na regulaciju izlučivanja inzulina (BADY i sur., 2006). Uloga GLUT2 u tankim crijevima jest prijenos glukoze, ali i galaktoze i fruktoze, van iz stanice na bazolateralnoj membrani (CHEESEMAN, 1993).

Prijenos glukoze na četkastoj membrani enterocita putem prijenosnika SGLT1 dobro je objašnjen pri nižim koncentracijama glukoze u lumenu crijeva (≤ 10 mM). No, prilikom viših koncentracija glukoze u lumenu crijeva (≥ 25 mM), koje se pojavljuju neposredno nakon obroka, uočena povećana apsorpcija glukoze ne može biti objašnjena prijenosom isključivo putem SGLT1. Smatra se da se povećanjem koncentracije glukoze u lumenu na oko 25 mM izjednačavaju aktivni i pasivni prijenos glukoze na četkastoj membrani enterocita, dok pri višim koncentracijama glukoze prevladava pasivan prijenos niz koncentracijski gradijent (NAFTALIN, 2014). Uočeno je da osim uobičajenog smještaja na bazolateralnim membranama, GLUT2 se može naći i na četkastoj membrani zbog visokih koncentracija glukoze u lumenu crijeva, i to već unutar nekoliko minuta (AFFLECK i sur., 2003). Iako postoji nekoliko teorija o čimbenicima koji utječu na premještanje GLUT2 na četkastu membranu enterocita, jedna je ipak najprihvaćenija. Najnovije spoznaje predlažu teoriju prema kojoj se zbog visoke koncentracije glukoze u lumenu crijeva i zasićenja SGLT1 pokreću mehanizmi koji uključuju aktiviranje PKC-a što dovodi do premještanja GLUT2 na četkastu membranu te se tako pospješuje apsorpcija glukoze niz koncentracijski gradijent (KELLETT i HELLIWELL, 2000; AU i sur., 2002; HELLIWELL i sur., 2003; KELLETT i BROT-LAROCHE, 2005; BOUDRY i sur., 2007; KELLETT i sur., 2008; ZHENG i sur., 2012). Uloga SGLT1 u regulaciji aktivnosti i premještaja GLUT2 na četkastoj membrani dodatno je dokazana u pokusima na

štakorima upotrebom glikozida florizin, specifičnog inhibitora aktivnosti SGLT1, kojim je unatoč visokoj intraluminalnoj koncentraciji glukoze spriječen prijenos glukoze u crijevima putem SGLT1 i posljedično tome i GLUT2 (KELLETT, 2001). Do danas u svinja nije dokazana prisutnost GLUT2 na četkastoj membrani zbog visoke intraluminalne koncentracije glukoze.

Zbog dugotrajne visoke koncentracije glukoze u lumenu tankog crijeva i stoga veće apsorpcije dolazi do povećanja koncentracije glukoze u međustaničnoj tekućini, što smanjuje koncentracijski gradijent na bazolateralnoj membrani enterocita te smanjuje prijenos glukoze iz stanice van na bazolateralnoj membrani i povećava koncentraciju glukoze unutar stanice. Ako povećanje koncentracije glukoze unutar stanice premašuje koncentraciju glukoze u lumenu tankog crijeva, okreće se smjer kojim glukoza tada putuje putem GLUT2 na četkastoj membrani niz koncentracijski gradijent. GLUT2 u tom slučaju djeluje kao šant glukoze na četkastoj membrani i tako sprječava pretjerano nakupljanje glukoze u citoplazmi enterocita. GLUT2 svojim djelovanjem smanjuje ukupni neto ulazak glukoze iz lumena u enterocit i tako regulira osmotski tlak unutar stanice, ali i razmješta luminalnu glukozu na distalnije dijelove tankog crijeva te tako izlaže veću površinu tankog crijeva glukozi (NAFTALIN, 2014). Ovu ulogu GLUT2 potkrepljuju istraživanja na miševima kojima je utvrđeno da prehrana bogata ugljikohidratima dvostruko povećava aktivnost SGLT1 unutar jednoga dana u distalnijim dijelovima tankog crijeva (DIAMOND i KARASOV, 1987). U pokusima na štakorima također je dokazano da zbog povećanja udjela ugljikohidrata u obroku raste izraženost GLUT2, ali i SGLT1, na četkastoj membrani, dok izraženost GLUT5 ostaje ista (MIYAMOTO i sur., 1991, 1992a). Gladovanje pak ima negativan utjecaj na izraženost GLUT2 na četkastoj membrani na proteinskoj, ali i na razini mRNK, dok hranjenje nakon gladovanja dovodi do brzog porasta izraženosti na proteinskoj i razini mRNK (HABOLD i sur., 2005).

Koncentracija glukoze u krvi sisavaca održava se stalno unutar uskih granica raznim regulatornim mehanizmima. Razinu glukoze nadgledaju senzori u α i β-stanicama Langerhansovih otočića gušterače koje izlučuju inzulin ili glukagon, ovisno o razini glukoze, i time daju odgovor na trenutačnu razinu glukoze i prilagođavaju apsorpciju i iskorištavanje glukoze u tkivima, najčešće u poprečnoprugastom mišićju i masnom tkivu. Najnovija istraživanja na pokusnim životinjama pokazuju da se senzori za glukozu ne nalaze samo u gušterači nego i u portalnoj veni, središnjem živčanom sustavu, glija-stanicama i u mišićnom i masnom tkivu (THORENS, 2015). GLUT2, osim uloge prijenosnika glukoze, ima ulogu senzora za glukozu u tkivima. U pokusima s genetski promijenjenim miševima koji nemaju

GLUT2 ustanovljeno je da su oni hiperglikemični, hipoinzulinemični, hiperglukagonemični i glikozurični te da ugibaju unutar tri tjedna starosti. Vraćanje aktivnosti GLUT2 takvim miševima dovodi do povratka izlučivanja inzulina i njegova djelovanja te uspostave homeostaze (BADY i sur., 2006).

Izraženost GLUT2 na razini mRNK utvrđena je kod svinja u jetrima, tankom crijevu bubregu i u manjoj mjeri u mozgu, plućima, mišićju i srcu (ASCHENBACH i sur., 2009; ZUO i sur., 2010). Istraživanja o raspodjeli izraženosti GLUT2 po pojedinim dijelovima tankog crijeva štakora na razini mRNK pokazala su najveću izraženost u duodenumu, a najmanju u jejunumu (CHANG WAYHS i sur., 2011), dok je kod svinja najveća izraženost bila u jejunumu i najmanja u ileumu što upućuje na to da se kod svinja većina glukoza apsorbira u proksimalnom i središnjem dijelu tankog crijeva (ZUO i sur., 2010). Izraženost GLUT2 na proteinskoj i mRNK razini ima jaku korelaciju što upućuje na to da se regulacija izraženosti GLUT2 odvija na transkripcijskoj razini (CUI i sur., 2003).

2.4. Apsorpcija glukoze u tankom crijevu

Enterociti nastaju u kriptama crijeva od multipotentnih crijevnih matičnih stanica (engl. *multipotent intestinal stem cells*, ISCs). Pritom putuju prema vrhu crijevne resice tijekom čega diferenciraju i poprimaju svoju funkciju uslijed aktivacije disaharidaza u četkastoj membrani i pokretanja prijenosnika za različite tvari u membranama enterocita, da bi na kraju, kada dođu do vrha crijevne resice, bili oljušteni u lumen crijeva. Taj proces obnove traje 2 – 3 dana kod glodavaca, 3 – 4 dana kod ovce i 5 – 6 dana kod ljudi, što upućuje i na različitost u veličini apsorptivnih površina crijeva kod glodavaca i ljudi. Stoga se duž crijevne resice fiziološki mogu naći enterociti u svim stadijima zrelosti. Kako enterocit sazrijeva, tako se aktivnost disaharidaza povećava (BUDDINGTON i DIAMOND, 1989; SHIRAZI-BEECHEY, 1995).

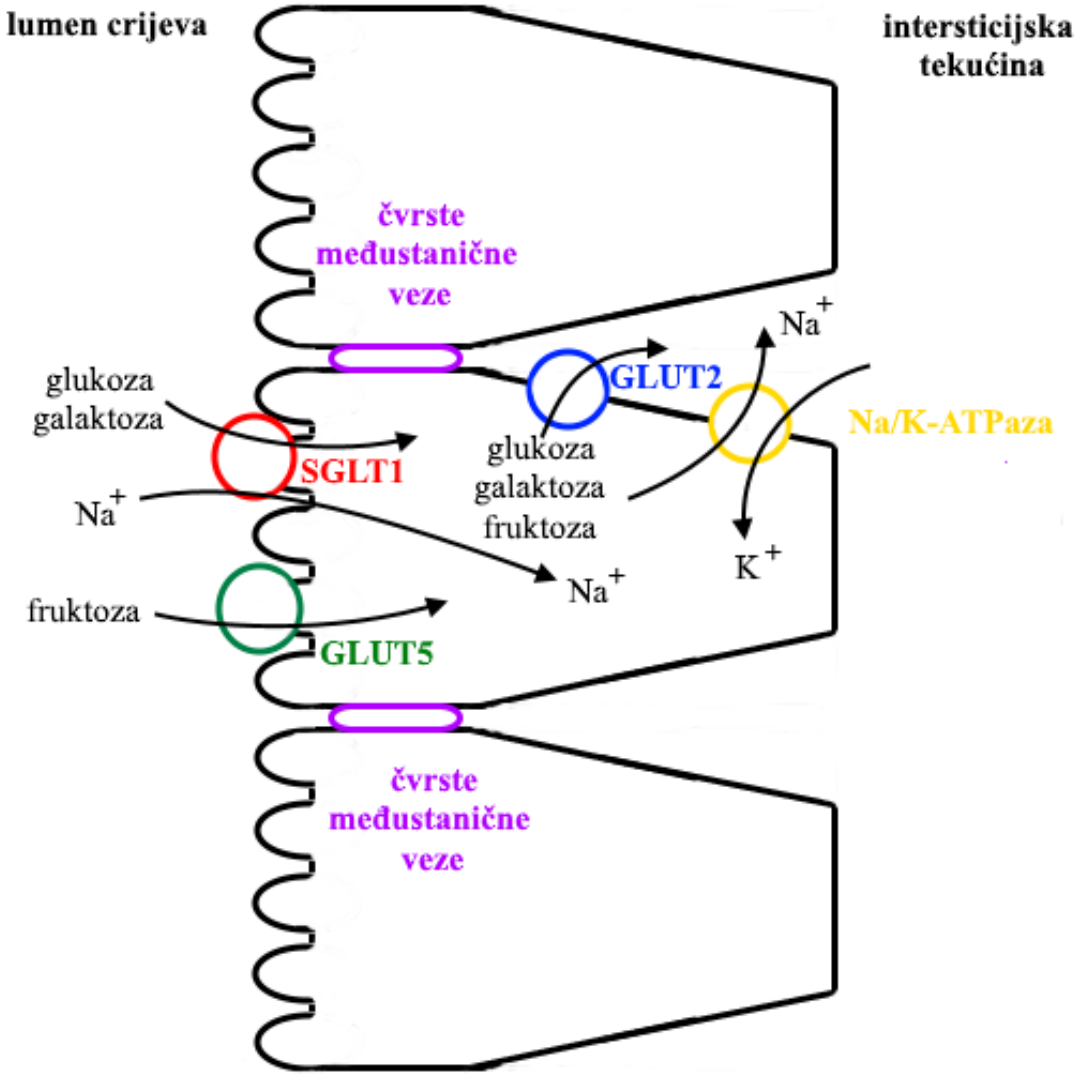
Stopa prijenosa glukoze kroz enterocite i aktivnost pojedinih disaharidaza iz četkaste membrane pokazuju razlike među pojedinim dijelovima tankog crijeva u svinje. Aktivnost laktaze, koja laktozu razgrađuje na glukozu i galaktozu, najviša je u proksimalnim dijelovima tankog crijeva, dok je u ileumu nema. Aktivnost trehalaze, koja razgrađuje trehalozu na dvije molekule glukoze, i celobiaze, koja razgrađuje celobiozu na dvije molekule glukoze, ima sličnu raspodjelu kao i laktaza, s time da bilježe nisku aktivnost i u ileumu. Aktivnost invertaze, koja

razgrađuje saharozu na fruktozu i glukozu, maltaze, koja razgrađuje maltozu na dvije molekule glukoze, i izomaltaze, koja razgrađuje izomaltozu na dvije molekule glukoze, najviša je pak u distalnijim dijelovima tankog crijeva. Ova razlika u aktivnosti pojedinih disaharidaza po pojedinim dijelovima tankog crijeva upućuje na razliku u mjestu apsorpcije pojedinih monosaharida (DAHLQVIST, 1961; GUYTON i HALL, 2006). Prije odbića prasadi, prijenos glukoze opada od duodenuma prema ileumu gdje je čak 4,5 puta manji nego u duodenumu. No, nakon odbića stopa prijenosa glukoze najveća je u jejunumu, zatim u ileumu i duodenumu. Pretpostavlja se da je promjena u raspodjeli stope prijenosa glukoze posljedica promijenjene prehrane nakon odbića. Uslijed toga se laktoza kao izvor ugljikohidrata zamjenjuje složenijim ugljikohidratima za čiju su probavu potrebni hidrolitički enzimi u lumenu crijeva, ali i enzimi smješteni u samoj četkastoj membrani koji kataliziraju ugljikohidrate na monosaharide, a kojih ima najviše u jejunumu (PUCHAL i BUDDINGTON, 1992; VEGA i sur., 1992).

FERRARIS i DIAMOND (1993) u svom istraživanju na miševima dokazuju da promjena u broju prijenosnika SGLT1 na crijevnoj resici, kao prilagodba na promjenu u hranidbi u obliku naglog povećanja ili smanjenja udjela ugljikohidrata u obroku, započinje u kriptama, gdje se nalaze nezreli enterociti, i da se tek nakon određenog vremena može uočiti promjena u prijenosu glukoze .

Prijenos glukoze kroz epitel neposredno započinje aktivnošću Na/K-ATPaze koja je smještena na bazolateralnoj membrani crijeva i koja svojom aktivnošću održava koncentraciju natrijevih i kalijevih iona u stanici. Na/K-ATPaza održava koncentracijski gradijent natrijevih iona primarno aktivnim prijenosom tri iona natrija iz stanice i dva iona kalija u stanicu, uz utrošak energije hidrolizom jedne molekule ATP-a. Relativno niža koncentracija natrija u citoplazmi enterocita u usporedbi s lumenom crijeva omogućuje da SGLT1, smješten na četkastoj membrani, u enterocit unosi zajedno s jednom molekulom glukoze i dva iona natrija. Upravo je navedeni prijenos natrijevih iona niz koncentracijski gradijent pokretačka sila ulaska glukoze. Prijenos glukoze putem SGLT1 na četkastoj membrani sekundarno je aktivan i kao takav ne koristi se energijom iz molekule ATP-a. Smatra se da zbog apsorpcije glukoze na četkastoj membrani enterocita putem prijenosnika SGLT1 dolazi do koncentriranja glukoze u vršnom dijelu citoplazme, koja bude metabolizirana u enterocitu za vlastite potrebe ili pak potiče pasivnu difuziju putem GLUT2 niz koncentracijski gradijent na bazolateralnim membranama enterocita. Na taj način glukoza iz enterocita dospije u međustaničnu tekućinu međustaničnih prostora neposredno ispod čvrstih međustaničnih veza (THORENS i sur.,

1990b; HWANG i sur., 1991; WRIGHT i sur., 1997; KELLETT, 2001; DROZDOWSKI i THOMSON, 2006; WRIGHT i sur., 2007). Tako objašnjen model prijenosa glukoze kroz enterocite poznat je u literaturi kao „klasični model apsorpcije glukoze“ (slika 4). Enterocit tijekom apsorpcije glukoze izgubi oko 30 % unutarstanične tekućine u međustanični prostor, što dovodi do širenja međustaničnog prostora ispod čvrstih međustaničnih veza te enterocit zbog toga poprima oblik krnjeg stošca s bazom na vršnoj membrani, a vrhom na bazalnoj membrani (PAPPENHEIMER i MICHEL, 2003). Tako prošireni međustanični prostor omogućuje primanje većih količina apsorbiranih tvari bez potrebe za putem do bazalne membrane i eventualnim prolaskom kroz mnogo manje propusnu membranu jezgre i mithohondrija smještene bliže bazalnoj membrani. (THORSEN i sur., 2014). Iako je uvriježeno da se izlazak glukoze iz enterocita putem GLUT2 odvija na bazolateralnoj membrani, PAPPENHEIMER i MICHEL (2003) u svom istraživanju dokazuju da je GLUT2 smješten u najvećoj mjeri na lateralnim dijelovima bazolateralne membrane enterocita, što je ujedno i mjesto gdje natrijevi ioni izlaze iz enterocita u međustanični prostor suprotno koncentracijskom gradijentu putem Na/K-ATPaze.



Slika 4. Klasični model apsorpcije glukoze u enterocitima. Glukoza i galaktoza se na četkastoj membrani enterocita prenose zajedno s dva iona natrija putem SGLT1. Koncentracijski gradijent iona natrija, koji je pokretačka sila za prijenos glukoze i galaktoze putem SGLT1, održava se bazolateralno smještenom Na/K-ATPazom. Fruktoza ulazi u enterocit na četkastoj membrani olakšanom difuzijom pomoću GLUT5. Bazolateralno smješten GLUT2 prenosi apsorbirane monosaharide van iz stanice olakšanom difuzijom niz koncentracijski gradijent. Preuzeto i prilagođeno od: DROZDOWSKI i THOMSON (2006).

Apsorpcija monosaharida u tankom crijevu svejeda učinkovit je proces koji sprječava nepotreban prolazak glukoze do debelog crijeva. Veće količine neprobavljenih ugljikohidrata u debelom crijevu mogu uzrokovati proljev zbog povećanja osmotskog tlaka unutar lumena crijeva, ali i pretjeranog rasta bakterija. Neapsorbirani ugljikohidrati koji dođu do debelog crijeva podliježu bakterijskoj razgradnji djelovanjem njihovih unutarstaničnih disaharidaza ili pak anaerobnoj fermentaciji kojom nastaju kratkolančane masne kiseline, vodik, ugljikov dioksid i metan. Kratkolančane masne kiseline mogu biti apsorbirane u debelom crijevu i tako postati izvor energije (CASPARY, 1992; CHEESEMAN, 2002).

Kako bi se spriječio nepotreban gubitak glukoze, postoji više teorija o dodatnom prijenosu glukoze u enterocite na četkastoj membrani, pogotovo u uvjetima povećane koncentracije glukoze u lumenu crijeva, ali samo su dvije najraširenije. Prva teorija tvrdi da glukoza prolazi mimo stanica, paracelularno, kroz čvrste međustanične veze koje bivaju otvorene, bilo aktivacijom putem SGLT1 bilo povećanjem koncentracije otopljenih tvari u lumenu crijeva (engl. *solvent drag*) (MADARA i PAPPENHEIMER, 1987; PAPPENHEIMER i REISS, 1987; DROZDOWSKI i THOMSON, 2006). Druga teorija, novijeg podrijetla, temelji se na pretpostavci da se GLUT2 može iz unutarstaničnih zaliha prebaciti na četkastu membranu putem signalnih mehanizama koji uključuju PKC, a pokrenuti su aktivacijom SGLT1 na četkastoj membrani enterocita. Pojavljivanje GLUT2, kao prijenosnika s manjim afinitetom, ali većim kapacitetom za prijenos glukoze u četkastoj membrani, mogao bi objasniti naglo povećanje prijenosa glukoze na četkastoj membrani u uvjetima povećane koncentracije glukoze u lumenu crijeva (KELLETT, 2001; AU i sur., 2002; HELLIWELL i sur., 2003). Određene skupine autora dugo su negirale prisutnost GLUT2 na četkastoj membrani, citirajući radove gdje se GLUT2 na imunohistokemijskim preparatima nalazi isključivo na bazolateralnoj membrani enterocita uz korištenje protutijela razvijenim na C-terminalni dio GLUT2 (THORENS i sur., 1990b, 1990c; SCOW i sur., 2011). Novija istraživanja, u kojima su se za imunohistokemijsku analizu koristila protutijela razvijena na glikoziliranu izvanstaničnu petlju od GLUT2, uspjela su dokazati prisutnost GLUT2 i na bazolateralnoj i na četkastoj membrani enterocita (AFFLECK i sur., 2003; AU i sur., 2002).

U preživača se najveći dio ugljikohidrata probavlja do kratkolančanih masnih kiselina procesom fermentacije u buragu, pod djelovanjem enzima mikroorganizama, te zbog toga vrlo mala količina ugljikohidrata dospijeva do tankog crijeva što za posljedicu ima značajno manju izraženost SGLT1 u tankom crijevu preživača u usporedbi sa svejedima (ZHAO i sur., 1998).

No, preživači zato imaju izraženu aktivnost SGLT1 u predželucima kako bi mogli apsorbirati hranom unesene monosaharide, koji ujedno i lako fermentiraju te mogu u prevelikoj količini uzrokovati kiselu indigestiju, tj. acidozu buraga (ASCHENBACH i sur., 2002).

2.5. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2

Poznato je da postoje spolne razlike u fiziološkim procesima, pa tako i u anatomiji i fiziologiji probavnog sustava. Više pH-vrijednosti u probavnom traktu, viša aktivnost glutationa u duodenumu, manja količina tekućine unutar probavnog trakta, manja aktivnost alkoholne dehidrogenaze, dulje vrijeme prolaska sadržaja duž crijeva kod žena samo su neke od razlika među spolovima uočene u probavnom sustavu ljudi (FREIRE i sur., 2011).

Spolne razlike uočene su i u samom metabolizmu ugljikohidrata. Estrogen utječe na homeostazu razine glukoze mijenjajući metabolizam glukoze u jetrima. Iako su mehanizmi tog utjecaja još uvijek nepoznati, dokazano je da estrogen potiče prijenos glukoze u tkiva mijenjajući izraženost pojedinih proteina i enzima odgovornih za metabolizam glukoze (CHEN i sur., 2009). S obzirom na to da su spolne razlike u izraženosti i funkciji prijenosnika nužnih za prijenos glukoze uočene u različitim organima, pretpostavlja se da se i mehanizmi kontrole razine glukoze u krvi razlikuju među spolovima (POMERLEAU i sur., 1999).

Poznato je da estrogen ima pozitivan utjecaj na krvožilni sustav, pogotovo na zaštitu srca od ishemije. DŽURBA i sur. (1997) ustanovili su da ženke štakora i pasa imaju veću izraženost Na/K-ATPaze u srcu od mužjaka te da se kastriranim ženkama pasa nakon davanja estradiola povećala izraženost Na/K-ATPaze u srcu u odnosu na kontrolnu skupinu nekastriranih ženki. QUINTAS i sur. (1997) dokazuju spolnu razliku u izraženosti Na/K-ATPaze na proteinskoj razini u bubrezima štakora koja je čak za 50 % veća u bubrezima ženki nego u mužjaka. Suprotne rezultate na bubrezima štakora dobili su pak JAVORKOVÁ i sur. (2009; 2010) koji su ustanovili da je α1-podjedinica Na/K-ATPaze jače izražena u mužjaka na proteinskoj razini. Aktivnost prijenosa natrijevih iona i izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK u plućima viša je u ženki štakora (KALTOFEN i sur., 2015).

Značajne spolne razlike i utjecaj spolnih hormona, odnosno inhibitorni utjecaj testosterona na prijenos glukoze (ženke > mužjaci) već su dokazane u plućima štakora (HART i sur., 1998), a spolne su razlike u izraženosti prijenosnika glukoze (ženke > mužjaci) dokazane u bubrezima štakora i miševa za SGLT1 (SABOLIĆ i sur., 2006; NAGAI i sur., 2014) te za GLUT2 u bubrezima i mozgu miševa (NAGAI i sur., 2014). U istraživanju na štakorima nije uočena spolna razlika u izraženosti SGLT1 u tankom crijevu (BALEN i sur., 2008). U probavnom sustavu pokusnih životinja, pa tako i svinja, spolne razlike u izraženosti prijenosnika nužnih za prijenos glukoze do sada nisu utvrđene.

Kod ljudi postoje spolne razlike u rezultatima oralnog testa na podnošljivost glukoze (engl. *oral glucose tolerance test*, OGTT). Uočeno je da žene imaju nižu koncentraciju glukoze u plazmi u početnom dijelu OGTT-a, ali zato višu nakon 2 – 3 sata OGTT-a od muškaraca, što upućuje na to da muškarci brže apsorbiraju glukozu u početnom dijelu OGTT-a, a žene pred kraj OGTT-a. Zbog sporije apsorpcije glukoze žene su imale i dulji poluživot glukoze u crijevima (ANDERWALD i sur., 2011).

2.6. Dijabetes i inzulin

Prema podatcima svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation,* WHO) 2014. godine bilo je 422 milijuna (8,5 % ukupne populacije) ljudi s dijabetesom. Usporedbe radi, 1980. godine bilo je zabilježeno 108 milijuna (4,7 % ukupne populacije) bolesnika (WHO, 2017). Pojavnost dijabetesa u žena dokazano je niža nego u muškaraca (WILD i sur., 2004).

Homeostaza razine glukoze u tijelu održava se koordinacijom triju procesa – apsorpcijom u tankim crijevima, glukoneogenezom u jetrima i utroškom u tkivima. Homeostaza razine glukoze u tijelu najvažniji je čimbenik za održavanje pravilnog metabolizma, a poremećaj te ravnoteže dovodi do mnogih metaboličkih poremećaja (GUYTON i HALL, 2006).

Šećerna bolest ili dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) jest metabolički poremećaj uzrokovan nedjelotvornošću inzulina, bilo njegovom nedovoljnom proizvodnjom bilo neodgovarajućim

odgovorom stanica na proizvedeni inzulin. Inzulin je peptidni hormon proizveden u β-stanicama Langerhansovih otočića gušterače koji održava homeostazu glukoze povećavanjem prijenosa glukoze iz krvi u tkiva i poticanjem sinteze glikogena (ASANO i sur., 2004). Dijabetes tipa 1 jest tzv. dijabetes ovisan o inzulinu i uzrokuje ga manjak proizvodnje inzulina, dok je dijabetes tipa 2 dijabetes neovisan o inzulinu, uzrokovan smanjenom osjetljivošću ciljnih tkiva na metaboličke učinke inzulina (GUYTON i HALL, 2006).

Dijabetes tipa 1 znatno smanjuje aktivnost Na/K-ATPaze u arteriolama mozga, i to znatnije u mužjaka nego u ženki štakora što upućuje na spolnu predodređnost u nastanku patoloških lezija u mikrocirkulaciji mozga te potencijalnu zaštitnu ulogu estrogena od nastanka lezija (SIEBER i sur., 2001). Za razliku od mozga, u jejunumu i ileumu te bubrezima dolazi do znatnog povećanja aktivnosti Na/K-ATPaze, ali i izraženosti na mRNK i proteinskoj razini, u štakora s umjetno izazvanim dijabetesom. Povećanje izraženosti Na/K-ATPaze na proteinskoj razini uzrokovanog povećanjem na mRNK razini pokazuje da je regulacija izraženosti gena uslijedila već na transkripcijskoj razini. S obzirom na to da dijabetes u tankom crijevu povećava prijenos glukoze preko četkaste i bazolateralne membrane, uočeno povećanje aktivnosti i izraženosti Na/K-ATPaze u tankom crijevu moglo bi biti jedan od mehanizama prilagodbe na staničnoj razini kako bi se povećao prijenos glukoze u enterocitima (WILD i sur., 1999; JAVORKOVÁ i sur., 2009).

Dijabetes tipa 2 pojačava izraženost prijenosnika za monosaharide SGLT1, GLUT2 i GLUT5 u tankim crijevima na mRNK i proteinskoj razini kod miševa (BURANT i sur., 1994) i ljudi, gdje je utvrđeno da osim izraženosti prijenosnika raste i aktivnost disaharidaza na četkastoj membrani (DYER i sur., 2002). Izraženost GLUT2 na četkastim membranama enterocita u jejunumu, neovisno o koncentraciji glukoze u lumenu crijeva, uočena je kod gojaznih ljudi, koji pak često znaju razviti dijabetes tipa 2 (AIT-OMAR i sur., 2011). Štakori s pokusno izazvanim dijabetesom imali su povećanu izraženost GLUT2 (MIYAMOTO i sur., 1992b) i GLUT5 (CORPE i sur., 1996) na proteinskoj razini u jejunumu, ali i na razini mRNK (MIYAMOTO i sur., 1991).

Zadržavanje natrijevih iona reapsorpcijom u bubrežnim kanalićima karakteristično je za dijabetes tipa 1 i 2. Dokazano je da inzulin povećava prijenos kalijevih iona u stanicu utječući na aktivnost Na/K-ATPaze u proksimalnim bubrežnim kanalićima (WEIDMANN i FERRARI, 1991), ali i u drugim tkivima (EWART i KLIP, 1995; SWEENEY i KLIP, 1998), što je pak u

suprotnosti s rezultatima istraživanja na jejunumu štakora gdje inzulin smanjuje izraženost Na/K-ATPaze na proteinskoj razini (SERHAN i KREYDIYYEH, 2010).

Iako postoji mnogo radova o utjecaju inzulina na mišićje, jetra i bubrege, vrlo je malo radova o utjecaju inzulina na apsorpciju glukoze u crijevima. Inzulin u štakora povećava apsorpciju glukoze i izraženost SGLT1 na proteinskoj razini u jejunumu (SERHAN i KREYDIYYEH, 2010).

Kako su već prethodna istraživanja na genetski modificiranim miševima koji nemaju GLUT2, a koji su zbog tog nedostatka povećali unos hrane, iako im je koncentracija glukoze u krvi regulirana parenteralnim davanjem glukoze, dokazala da GLUT2 osim uloge prijenosnika ima i ulogu senzora za glukozu (BADY i sur., 2006), već dulje vrijeme postoji interes za proučavanjem uloge tankog crijeva u homeostatskom održavanju razine glukoze u krvi tijekom dijabetesa. Hiperglikemija koja se pojavljuje zbog dijabetesa tipa 2 posljedica je sustavne rezistencije na inzulin te se kontrola razine glukoze često pokušava uspostaviti upotrebom oralnih antidijabetika. Dokazana razlika u raspodjeli prijenosnika odgovornih za prijenos glukoze duž tankog crijeva mogla bi imati utjecaja na učinkovitost pojedinih lijekova (HERRMANN i sur., 2012).

Farmaceutska industrija danas nudi dva pristupa kako kontrolirati apsorpciju glukoze u tankim crijevima kod ljudi s dijabetesom – inhibicija aktivnosti enzima kako bi se usporila probava složenih ugljikohidrata i inhibicija aktivnosti SGLT1 s tvarima sličnim florizinu. Inhibicija SGLT1 u tankim crijevima mogao bi biti mehanizam kojim se smanjenjem apsorpcije glukoze u tankom crijevu utječe na razinu glukoze u krvi nakon obroka. Do sada nema dopuštenog SGLT1 inhibitora, iako na tržištu postoje SGLT2 inhibitori koji variraju u selektivnosti te jednim dijelom inhibiraju i SGLT1. Inhibitori SGLT2 smanjuju ili sprječavaju reapsorpciju glukoze u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega te tako uzrokuju glukozuriju i snižavaju koncentraciju glukoze u krvi (LEHMANN i HORNBY, 2016).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Kako ugljikohidrati čine najveći količinski i energetski udio u prehrani ljudi, ali i svinja, velika se pozornost već godinama pridaje proučavanju metabolizma ugljikohidrata. Apsorpcija monosaharida u tankom crijevu jedan je od ključnih koraka probave ugljikohidrata i njihova metabolizma, a izravno je ovisna o funkcionalnoj izraženosti prijenosnika uključenih u apsorpciju glukoze: Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2. Izraženost i raspodjela Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu opisane su većinom u štakora i miševa, dok podataka za svinje manjka. Zahvaljujući studijama na laboratorijskim glodavcima, poznato je da postoje spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u bubrezima te u plućima i mozgu štakora i miševa. No, dosad se navedene razlike nisu uspjele utvrditi u probavnom sustavu laboratorijskih glodavaca, pa tako i svinja.

Dijabetes kao poremećaj metabolizma glukoze, i jedan od najučestalijih metaboličkih poremećaja uopće kod ljudi, također pokazuje razlike u učestalosti među spolovima koja je dokazano niža u žena. Kako već dulje vrijeme postoji interes za proučavanjem uloge tankog crijeva u homeostatskom održavanju razine glukoze u krvi tijekom dijabetesa, postojanje spolnih razlika u izraženosti prijenosnika glukoze mogle bi djelomično objasniti zašto je pojavnost dijabetesa manja u žena nego u muškaraca.

Uočene sličnosti između čovjeka i svinje u anatomiji i fiziologiji probavnog sustava čine svinju modelom prvog izbora za proučavanje fiziologije probavnog sustava ljudi, pogotovo u istraživanjima apsorpcije i biodostupnosti hranjivih tvari.

Hipoteza ovog istraživanja jest da u tankom crijevu svinje postoje spolne razlike u izraženosti triju glavnih prijenosničkih proteina, Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2, uključenih u prijenos glukoze kroz membranu enterocita.

Kako bi se testirala hipoteza na eksperimentalnom modelu svinje, postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. Potvrditi izraženost i staničnu lokaciju Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu svinje, uz pomoć lančane reakcije polimeraze (PCR), *western*-analize i imunofluorescencije.

2. Odrediti optimalne uvjete za prikaz Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu svinje metodama imunohistokemije na kriostatskim narescima tkiva i *western*-analize u izoliranim staničnim membranama.
3. Istražiti raspodjelu izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 po pojedinim dijelovima tankog crijeva, tj. u duodenumu, jejunumu i ileumu.
4. Istražiti moguće spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu spolno zrelih svinja.
5. Istražiti utjecaj kastracije na izraženost Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu spolno zrelih svinja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pokusne životinje

U ovom istraživanju koristila sam odrasle mužjake i ženke svinja pasmine švedski landras sa svinjogojske farme Kaznionice i zatvora u Požegi. Životinje su uzgajane i držane u svrhu tova te ekonomske iskoristivosti svinjskog mesa. Tijekom čitavog istraživanja svinje su boravile u skupinama u boksu i bile hranjene kompletnim komercijalnim krmnim smjesama za svinje u tovu, i to do 60 kg tjekesne mase s krmnom smjesom ST_1 koja je sadržavala 16 % sirovih proteina i 12,89 MJ metaboličke energije (ME), a do 100 kg tjelesne mase s krmnom smjesom ST_2 koja je sadržavala 13 % sirovih proteina i 13,78 MJ ME. Pokuse je odobrilo Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu (klasa: 640-01/16-17/71; ur. br.: 251-61-01/139-16-2).

4.2. Kemikalije, pribor i protutijela

Od tvrtke Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD) korišteni su: albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA), fenil-metil-sulfonil-fluorid (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF), manitol, etilen-glikol-bis(β-aminoetil eter)-N,N'-tetraoctena kiselina (EGTA), Triton-X-100, 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (BCIP), nitro blue tetrazolium, (NBT), RNAlater®, Sigmafast™, kalijev klorid (KCl), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), natrijev klorid (NaCl), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), Tris hidroklorid, tj. 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol hidroklorid (Tris/HCl), natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium-dodecyl sulfate*, SDS), akrilamid/bisakrilamid (29:1), amonijev persulafat (APS), β-merkaptoetanola (β-ME), metanol, octena kiselina. Od tvrtke Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, SAD) korišteni su: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED). Od tvrtke Serva (Heidelberg, Njemačka) korišten je Coomassie Brilliant Blue G-250, glicerol. Od tvrtke Vétoquinol S.A. (Magny-Vernois, Francuska) korišteni su anestetici Narketan® (ketamin) i Xylapan® (ksilazin). Od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska) korišteni su kemikalije: bromfenolsko plavilo (BPB, engl. *brom-phenol-blue*), paraformaldehid (PFA), saharoza, izopropanol, etanol i limunska kiselina. Od tvrtke Fischer Scientific (Hampton, NH, SAD) korišteni su: natrijev azid (NaN_3), Tris-acetat-etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) pufer (TAE pufer). Od tvrtke Dako (Carpinteria, CA, SAD) korištena je otopina za očuvanje fluorescencije Dako Fluorescent Mounting Media. Od tvrtke Biognost (Zagreb, Hrvatska)

korištena su adhezivna predmetna stakla VitroGnost® Plus Ultra i pokrovna stakla te sredstvo za uklapanje CryoFix gel.

Komercijalna primarna protutijela, mišje monoklonsko na Na/K-ATPazu (Na^+/K^+-ATPase α (H-3), sc-48345) i kozje poliklonsko na GLUT2 (Glut2 (C-19), sc-7580), korištena su od proizvođača Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, SAD), dok je kunićje poliklonsko protutijelo na SGLT1 (anti-SGLT1 antibody, ab14686) od proizvođača Abcam (Cambridge, UK). Nekomercijalno primarno kunićje poliklonsko protutijelo na SGLT1 donirano je ljubaznošću prof. dr. sc. Hermanna Koepsella, Institut za anatomiju i biologiju stanice, Sveučilište u Würzburgu, Würzburg, Njemačka. Komercijalna sekundarna protutijela, obilježena fluorescentnom molekulom cijanin-3 (CY3), koja su korištena za imunohistokemijsku analizu, jesu magareće protutijelo protiv mišjeg IgG (Cy™3 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG, 715-165-151) (DAM-CY3), kozje protutijelo protiv kunićjeg IgG (Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, 111-165-144) (GAR-CY3) i magareće protutijelo protiv kozjeg IgG (Cy™3 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG, 705-165-147) (DAG-CY3) proizvođača Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, SAD). Komercijalna sekundarna protutijela s vezanim enzimom alkalnom fosfatazom (AP), koja su korištena u *western*-analizi, jesu kozje protutijelo protiv mišjeg IgG (goat anti-mouse IgG-AP, sc-2008) (GAM-AP), kozje protutijelo protiv kunićjeg IgG (goat anti-rabbit IgG-AP, sc-2007) (GAR-AP) i goveđe protutijelo protiv kozjeg IgG (bovine anti-goat IgG-AP, sc-2353) (BAG-AP) proizvođača Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, SAD).

4.3. Postupci sa životinjama

4.3.1. Kastracija

Kako bih ispitala utjecaj spola i kastracije na izraženost prijenosnika uključenih u prijenos glukoze, koristila sam kastrirane (n = 10) i lažno kastrirane (n = 10) mužjake i ženke. U dobi od 4 tjedna bila je napravljena kastracija mužjaka (n = 5) i ženki (n = 5), dok su kontrolni mužjaci (n = 5) i kontrolne ženke (n = 5) bili lažno kastrirani. Mužjaci su kastrirani kroz skrotum, dok su ženke kastrirane paralumbalnim pristupom pod općom anestezijom (ketamin 10 mg/kg t. m. i ksilazin 2 mg/kg t. m.). Lažno kastrirane životinje prošle su isti operacijski

postupak, ali bez uklanjanja gonada. Nakon operacijskih postupaka i oporavka svinje su vraćene boksove gdje su boravile u skupinama do kraja pokusa.

4.3.2. Klanje

Nakon provedenog pokusa, odnosno dostizanja spolne zrelosti u dobi od 10 mjeseci, životinje su upućene na tehnološko klanje u klaonicu Papuk, mesna industrija d.o.o. u Požegi, gdje su omamljene i zaklane. Organi probavnog sustava (od želuca do rektuma) nakon uklanjanja iz trupa životinje na liniji klanja odmah su potopljeni u ledeno hladnu vodu kako bi se usporili procesi autolize stanica te se odmah pristupilo uzorkovanju pojedinih dijelova tankog crijeva (duodenum, jejunum i ileum) .

4.4. Postupci s tkivima

4.4.1. Imunohistokemijska analiza

4.4.1.1. Uzorkovanje i fiksacija tkiva

Uzorci za imunohistokemijsku analizu uzeti su iz središnjeg dijela duodenuma, jejunuma i ileuma te su isprani u hladnom PBS-u (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH 7,4) u tri niza i fiksirani 4% PFA u PBS-u. Uzorci su držani u istom fiksativu tijekom 24 sata pri 4 ºC, nakon čega su izdašno isprani u PBS-u i do daljnje upotrebe pohranjeni na 4 ºC u PBS-u koji sadržava 0,02 % NaN_3.

4.4.1.2. Priprema histoloških preparata

Fiksirani uzorci tkiva prvo su namočeni preko noći na 4 ºC u 30 %-tnoj otopini saharoze kako bi se dehidrirali i tako zaštitile stanične strukture prilikom zamrzavanja. Tkivo se potom uklopilo u polimerni uklopni medij CryoFix gel (Biognost, Zagreb, Hrvatska) i zamrznulo u kriostatu Leica CM 1580 (Leica Instruments, Nussloch, Njemačka) na temeperaturu od -25 ºC

tijekom 45 minuta. Tkivni naresci debljine 5 μm prikupljeni su i nalijepljeni na adhezivna predmetna stakla. Tako pripremljeni uzorci sušili su se tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi i potom su pohranjeni u hladnjaku na 4 ºC do daljnje upotrebe.

4.4.1.3. Imunohistokemija

Kako PFA specifično prikriva epitope prilikom fiksiranja, svaki par protutijelo-epitop ima specifične uvjete za optimalno dokazivanje u tkivnim narescima. Kako bi se uspješno obilježili epitopi na uzorcima sa specifičnim protutijelom, najprije su se odredile optimalne metode otkrivanja antigena kojima se u tkivu dodatno denaturiraju proteini i uklanjaju lipidi. Metode otkrivanja antigena uključuju namakanje uzoraka u citratnim puferima različitih pH-vrijednosti, postupke s tretmanom ili bez tretmana detergentima i alkoholima ili pak postupke sa zagrijavanjem ili bez zagrijavanja u mikrovalnoj pećnici (SABOLIĆ i sur., 2007; BRZICA i sur., 2009). Postupkom otkrivanja antigena utvrđeno je da je za Na/K-ATPaza, SGLT1 i GLUT2 protutijelo optimalan protokol koji uključuje obradu uzoraka u mikrovalnoj pećnici u 10 mM citratnom puferu pH = 6, koji se sastoji od sljedećih koraka: rehidracija u PBS-u 15 minuta, kuhanje u mikrovalnoj pećnici (800 W) u citratnom puferu tijekom četiri ciklusa po 5 minuta, hlađenje na sobnoj temperaturi u istom puferu 20 minuta, ispiranje u PBS-u tri puta po 5 minuta, inkubacija u 0,5 %-tnom Triton-X-100 15 minuta, inkubacija u 2 %-tnom Triton-X-100 30 minuta, ispiranje u PBS-u dva puta po 5 minuta te blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela u 1 %-tnoj otopini BSA u PBS-u tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon postupka otkrivanja antigena tkivni su naresci inkubirani u primarnom protutijelu tijekom noći u hladnjaku na 4 ºC, zatim su isprani u 0,1 %-tnom Triton-X-100 dva puta po 5 minuta te inkubirani u sekundarnom protutijelu tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Korištena primarna i sekundarna protutijela te njihova razrjeđenja prikazana su u tablici 1. Nakon inkubacije u sekundarnom protutijelu tkivni su naresci isprani prvo u 0,1 %-tnom Triton-X-100 tijekom 10 minuta, a zatim dva puta po 5 minuta u PBS-u te prekriveni otopinom za očuvanje fluorescencije Dako Fluorescent Mounting Media i prekriveni pokrovnim staklom.

Gotovi imunohistokemijski preparati pretraženi su fluorescencijskim mikroskopom OPTON III RS (Opton Feintechnik, Oberkochen, Njemačka) i snimljeni priključenom digitalnom kamerom SPOT RT (Diagnostic Intruments, Sterling Heights, MI, SAD) te su

dobivene snimke obrađene u programu Adobe Photoshop CC (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, SAD).

Tablica 1. Primarna i sekundarna protutijela korištena u imunohistokemiji.

Prijenosnik	Proizvođač primarnog protutijela	Razrjeđenje primarnog protutijela	Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje sekundarnog protutijela
Na/K-ATPaza	Santa Cruz Biotechnology	1 : 400	DAM-CY3	1 : 400
SGLT1	Abcam	1 : 200	GAR-CY3	1 : 500
GLUT2	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	DAG-CY3	1 : 400

4.4.2. *Western*-analiza

4.4.2.1. Uzorkovanje i homogenizacija tkiva

Tijekom uzorkovanja tkiva za *western*-analizu pazilo se da tkivo čitavo vrijeme, tijekom uzorkovanja i homogenizacije, bude na hladnome (ledena podloga, homogenizacija u ledu). Uzorku, prosječne dužine oko 8 cm, od svakoga dijela crijeva (duodenum, jejunum i ileum) se, nakon podužnog otvaranja i ispiranja u hladnom PBS-u u tri niza, sastrugala sluznica stijenke crijeva pomoću predmetnog stakla. Uzorci sastrugane sluznice stavljeni su u omjeru 1 : 9 u hladni pufer za homogenizaciju (300 mM manitol, 5 mM EGTA, 12 mM Tris/HCl, 1 mM PMSF, pH 7,4) uz dodatak inhibitora proteaza Sigmafast™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) (omjer uzorak/pufer 1 : 9) i homogenizirani električnim homogenizatorom IKA T10 basic Ultra-Turrax® (IKA Werke, Staufen, Njemačka) na najjačoj brzini – 1 minuta homogenizacija, 2 minute pauza, 1 minuta homogenizacija. Homogenizirani uzorci tkiva pohranjeni su na -80 ºC do daljnje upotrebe.

4.4.2.2. Izdvajanje ukupnih staničnih membrana (USM)

Homogeniziranim je uzorcima dodan pufer za izolaciju USM-I (isti sastav kao pufer za homogenizaciju, samo bez dodatka inhibitora proteaza) do jednakog volumena i ponovno su

homogenizirani na ledu u ručnom staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom Omni-Mixer (Sorvall Instruments, Newton, CT, SAD) 1 minutu na srednjoj brzini. USM izdvojene su metodom diferencijalnog centrifugiranja u centrifugi s hlađenjem Sorvall RC-5C (rotor SS-34) (Sorvall Instruments, Newton, CT, SAD) iz homogeniziranih uzoraka. Prvo su homogenizirani uzorci centrifugirani na 6500 rpm (5000 ×g) tijekom 15 minuta kako bi se najprije istaložio stanični talog koji čine cijele stanice, jezgre i nerazgrađeni tkivni matriks. Dobiveni nadtalog se zatim još jednom centrifugirao na 20 000 rpm (50 000 ×g) tijekom 1 sata pri čemu su se istaložili USM-i. Talog s izdvojenim USM-om se uz pomoć plastičnog štapića i pipete otopio u puferu za izolaciju USM-II (pufer za izolaciju USM-I razrijeđen s deH_2O 1 : 1).

4.4.2.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u izdvojenim USM-ima mjerena je spektrofotometrijski, metodom po Bradfordu (BRADFORD, 1976). Metoda se temelji na reakciji vezanja boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteine, pri čemu joj se mijenja ionsko stanje te apsorbira svjetlost valne dužine od 595 nm. Standardna krivulja koncentracije proteina izrađena je pomoću otopine BSA u koncentracijskom rasponu od 0,2 do 1,2 mg/mL. Uzorci su razrjeđivani tako da im optička gustoća bude u linearnom području standardne krivulje. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi u otopini boje, optička gustoća uzoraka očitana je naspram slijepe probe (uzorak bez proteina) na spektrofotometru CECIL 9000 (Cecil Instruments, Cambridge, Engleska, UK). Pripadajuće koncentracije proteina uzoraka očitane su iz standardne krivulje.

4.4.2.4. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i *western*-analiza

Prije denaturirajuće elektroforeze proteina u poliakrilamidnom gelu (natrijev dodecilsulfat-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu ili SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), uzorci izdvojenih ukupnih staničnih membrana priređeni su miješanjem u Laemmli-puferu, tj. puferu za denaturaciju proteina (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (22 % v/v), 30 % SDS (12 % v/v), 80 % glicerol (54 % v/v), zasićena otopina BPB (12 % v/v)) s dodatkom 5 % β-ME. Konačna koncentracija proteina u svim uzorcima podešena je na 4 μg/μL. Uzorci su zatim dodatno denaturirani zagrijavanjem na različitim temperaturama

(37 ºC/30 min, 65 ºC/15 min, 95 ºC/5 min) radi određivanja osjetljivosti pojedinih antigena na termičku razgradnju.

Tijekom okomite diskontinuirane SDS-PAGE elektroforeze proteini najprije prolaze kroz gel za sabijanje (30 % akrilamid/bis-akrilamid (29 : 1) (4 % v/v)), a zatim se razdvajaju u električnom polju na temelju njihove molekularne mase u gelu za razdvajanje (30 % akrilamid/bis-akrilamid (29 : 1) (10 % v/v)). Za izvedbu okomite diskontinuirane SDS-PAGE elektroforeze korištena je aparatura Mini Protean II Cell (BioRad, Hercules, CA, SAD) uz konstantan napon od 100 V tijekom 2 sata i PAGE-pufer (25 mM Tris, 0,2 M glicin, 1 % SDS) u kojemu su bili potopljeni gelovi. Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina na temelju molekularne mase, razdvojeni proteini na gelu elektroforetski su preneseni na hidrofobnu sintetsku PVDF membranu Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, SAD) u aparaturi za tzv. mokri prijenos Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Hercules, CA, SAD), uz konstantan napon od 100 V tijekom 2 sata i tzv. transfer-pufer (15,6 mM Tris, 120 mM glicin, 20 % metanol). Provjera uspješnosti prijenosa proteina s gela na PVDF membranu obavljena je bojenjem membrane u otopini Coomassie blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1 % m/v) u smjesi metanola, deH_2O i octene kiseline (5v : 4v : 1v)), a potom je isprana u otopini za odbojavanje (metanol, deH_2O, octena kiselina (5v : 4v : 1v)) te isprana u deH_2O kako bi se uklonila kisela otopina za odbojavanje. Nespecifično vezanje protutijela spriječeno je inkubacijom PVDF membrane u otopini za blokiranje (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, Triton X-100 (1 % v/v), nemasno mlijeko u prahu 5 % (m/v), pH 7,4) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Ovako obezbojene i blokirane PVDF membrane dalje su namakane u otopini primarnog protutijela (razrijeđenog u otopini za blokiranje) preko noći uz miješanje na 4 ºC, zatim su višekratno isprane u otopini za blokiranje tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo namakanje tijekom 1 sata u otopini sekundarnog protutijela na sobnoj temperaturi. Korištena primarna i sekundarna protutijela te njihova razrjeđenja prikazana su u tablici 2. Sekundarna protutijela korištena za *western*-analizu su u kompleksu s alkalnom fosfatazom (AP). Optimalna razrjeđenja svakoga protutijela ispitana su u prethodnim pokusima. Sekundarno protutijela isprano je s otopinom za blokiranje tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi i u PBS-u tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Imunodetekcija proteinskih pruga na PVDF membrani postignuta je kolorimetrijskom reakcijom dodavanjem kromogenih supstrata BCIP i NBT alkalnoj fosfatazi kojom na mjestu vezanja protutijela dolazi do enzimske reakcije čiji je produkt smeđo-ljubičasto obojenje (MIKOČ, 2007). Jačina obojenja proteinskih pruga

razmjerna je količini prisutnog antigena, što omogućuje denzitometrijsku analizu sadržaja antigena u uzorcima.

Dobivene proteinske pruge na PVDF membranama skenirane su i njihova je gustoća denzitometrijski izmjerena i analizirana pomoću slobodno dostupnog programa ImageJ (NIH, Bethesda, SAD).

Tablica 2. Primarna i sekundarna protutijela korištena za *western*-analizu.

Prijenosnik	Proizvođač primarnog protutijela	Razrjeđenje primarnog protutijela	Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje sekundarnog protutijela
Na/K-ATPaza	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1 : 1000	GAM-AP	1 : 1000
SGLT1	Institut za anatomiju i biologiju stanice, Sveučilište u Würzburgu, Njemačka	1 : 200	GAR-AP	1 : 500
GLUT2	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1 : 500	BAG-AP	1 : 500

4.4.3. Analiza lančanom reakcijom polimeraze

4.4.3.1. Uzorkovanje i izdvajanje ukupne RNK

Nakon uzorkovanja komadića tkiva, prosječne mase 20 mg, iz središnjeg dijela duodenuma, jejunuma i ileuma, te ispiranja u hladnom PBS-u u tri niza, uzorci su pohranjeni u otopinu RNAlater (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) na -18 ºC do kako bi se očuvala cjelovitost RNK do daljnje upotrebe.

Sluznica uzoraka crijeva ručno je odvojena od stijenke crijeva i korištena za daljnje izdvajanje RNK. Ukupna stanična RNK iz tkiva izdvojena je upotrebom otopine RNAisoPlus (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) prema uputama proizvođača. Izdvojena RNK pročišćena je upotrebom komercijalnog kita za pročišćivanje RNK RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden,

Njemačka). Čistoća izdvojene RNK i njezina koncentracija određene su mjerenjem optičke gustoće na valnoj dužini od 260 i 280 nm na mikrovolumenskom spektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu, Kyoto, Japan). Cjelovitost izdvojene RNK i moguće onečišćenje s DNK molekulama provjereni su horizontalnom elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, SAD) koji je sadržavao boju za nukleinske kiseline GelStar™ (Lonza, Rockland, ME, SAD). Gelovi su osvijetljeni UV-transiluminatorom Safe Imager™ (Invitrogen, San Jose, CA, SAD) i fotografirani digitalnim fotoaparatom (Uvitec, Cambridge, UK). Izdvojena i pročišćena RNK pohranjena je na -80 ºC do daljnje upotrebe.

4.4.3.2. Reakcija obrnutog prepisivanja

Reakcija obrnutog prepisivanja (engl. *reverse transcription*, RT), tj. sinteza cDNK, izvedena je u ukupnom volumenu od 20 µL koristeći komercijalnu reverznu transkriptazu virusa mišje leukemije (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukupna stanična RNK (2 µg) denaturirana je na 65 ºC tijekom 5 minuta u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 0,4 µg nasumičnih početnica Random Hexamers (Qiagen, Hilden, Njemačka) i 0,5 mM dNTP smjese, odnosno smjese koja sadržava jednak maseni udio sva četiri deoksinukleotid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Denaturirani uzorci RNK naglo su ohlađeni na ledu te im je dodan ostatak reakcijske smjese, koji sadržava 1x pufer za RT, 10 mM ditiotreitola (DTT) i 40 jedinica inhibitora ribonukleaza RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i inkubirani su na 37 ºC tijekom 2 minute. Na kraju je reakcijskoj smjesi dodano 200 jedinica M-MLV RT te je sparivanje početnica započelo inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, a zatim se na 37 ºC tijekom 50 minuta odvijala sinteza prvog lanca cDNK. Nakon završetka sinteze cDNK reakcijska je smjesa zagrijana na 70 ºC tijekom 15 minuta čime se inaktivirala M-MLV RT. Uz svaku RT reakciju provođena je i negativna kontrolna reakcija bez ukupne stanične RNK, uz isti volumen čiste vode bez ribonukleaza i deoksiribonukleaza, kako bi se provjerila moguća kontaminacija DNK molekulama. Dobivena cDNK pohranjena je na -18 ºC do daljnje upotrebe.

4.4.3.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) izvedena je u ukupnom volumenu od 25 µL. PCR reakcijska smjesa sadržavala je 1 µL (100 ng) cDNK, 1 µL (0,4 µM) specifičnih početnica, 12,5 µL 2x EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) i 10,5 µL čiste vode bez ribonukleaza i deoksiribonukleaza.

Sljedovi specifičnih početnica dobiveni su pomoću slobodno dostupnog programa Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), nakon pronalaženja određenih nukleotidnih sekvencija u računalnoj bazi *Nacionalnog centra za* biotehnološke informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Obilježja samih početnica dodatno su utvrđena slobodno dostupnim programom Oligonucleotide Properties Calculator (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html). Sve korištene početnice (Metabion International AG, Planegg, Njemačka) i veličine PCR produkata navedene su u tablici 3.

PCR reakcija sastoji se od tri dijela. U prvoj fazi dolazi do denaturacije DNK molekule, u drugoj fazi do sparivanja početnica, a u trećoj fazi do produljivanja DNK lanca. Nakon određivanja optimalne temperature za pojedine faze PCR reakcije i broja ciklusa, korišteni su sljedeći uvjeti: denaturacija 10 sekundi na 98 ºC, sparivanje početnica 30 sekundi na 60 ºC te produžavanje DNK lanca na 72 ºC tijekom 45 sekundi u 30 ciklusa za SGLT1 i GLUT2 i denaturacija 10 sekundi na 98 ºC, sparivanje početnica 30 sekundi na 59 ºC te produžavanje DNK lanca na 72 ºC tijekom 45 sekundi u 30 ciklusa za Na/K-ATPazu i 28 ciklusa za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,* GAPDH, EC 1.2.1.12). Početna denaturacija na 94 ºC tijekom 3 minute i završno produžavanje lanca DNK na 72 ºC tijekom 10 minuta bilo je zajedničko svim PCR reakcijama. Uz svaku PCR reakciju provođena je i negativna kontrolna reakcija bez cDNK, uz isti volumen čiste vode bez ribonukleaza i deoksiribonukleaza. PCR produkti nisu uočeni ni u negativnim kontrolama od RT reakcije ni u negativnim kontrolama PCR smjesa (nije prikazano na slikama).

PCR produkti razdvojeni su horizontalnom elektroforezom na 1,5 %-tnom agaroznom gelu s dodatkom GelStar™ boje za nukleinske kiseline te osvijetljeni UV-transiluminatorom i fotografirani digitalnim fotoaparatom. Denzitometrijskim mjerenjem pruga na agaroznom gelu

pomoću programa ImageJ utvrđeni su relativni odnosi intenziteta dobivenih pruga za Na/K-ATPazu, SGLT1 i GLUT2 naspram pruga referentnog gena GAPDH.

Tablica 3. Oligonukleotidni sljedovi početnica korištenih u PCR reakcijama

Geni	Nukleotidni slijed (5'-3')	Položaj i registracijski broj u bazi podataka	Veličina PCR produkta (pb)
Na/K-ATPaza	GAGCATGGCGACAAAAAGAA TTGAATGCCATAGGCCAAGA	82-101 362-381 NM_214249.1	300
SGLT1	GGCTGGACGAAGTATGGTGT TGAATATGGCCCCAGAGAAG	188-207 494-513 NM_001164021.1	326
GLUT2	GCCAGCTGTTCTCCAATCTC AACAGGTTGGCTGATTCCAG	682-701 999-1018 NM_001097417.1	337
GAPDH	CCAGAACATCATCCCTGCTT AGCTTGACGAAGTGGTCGTT	703-722 1004-1023 NM_001206359.1	321

4.5. Prikaz i statistička obrada podataka

Podatci dobiveni imunohistokemijskom, *western*-analizom i analizom lančane reakcije polimerazom prikazani su reprezentativnim nalazom za 4 nezavisna uzorka u skupini. Denzitometrijska mjerenja napravljena su na tri različita mjesta na proteinskim prugama i na prugama PCR produkata te su uprosječena za svaki uzorak posebno i prikazana kao relativne vrijednosti naspram gustoće najjače pruge (vrijednost = 1) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka. Brojčani podatci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statistička analiza dobivenih rezultata istraživanja obrađena je metodom deskriptivne statistike, a ispitivanje značajnosti razlika između i unutar skupina, ovisno o normalnosti raspodjele vrijednosti svojstava, Studentovim t-testom, Mann-Whitneyevim U-testom ili pomoću analize varijance (ANOVA) na razini vjerodostojnosti $p < 0,05$, upotrebom računalnog programa Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

5. REZULTATI

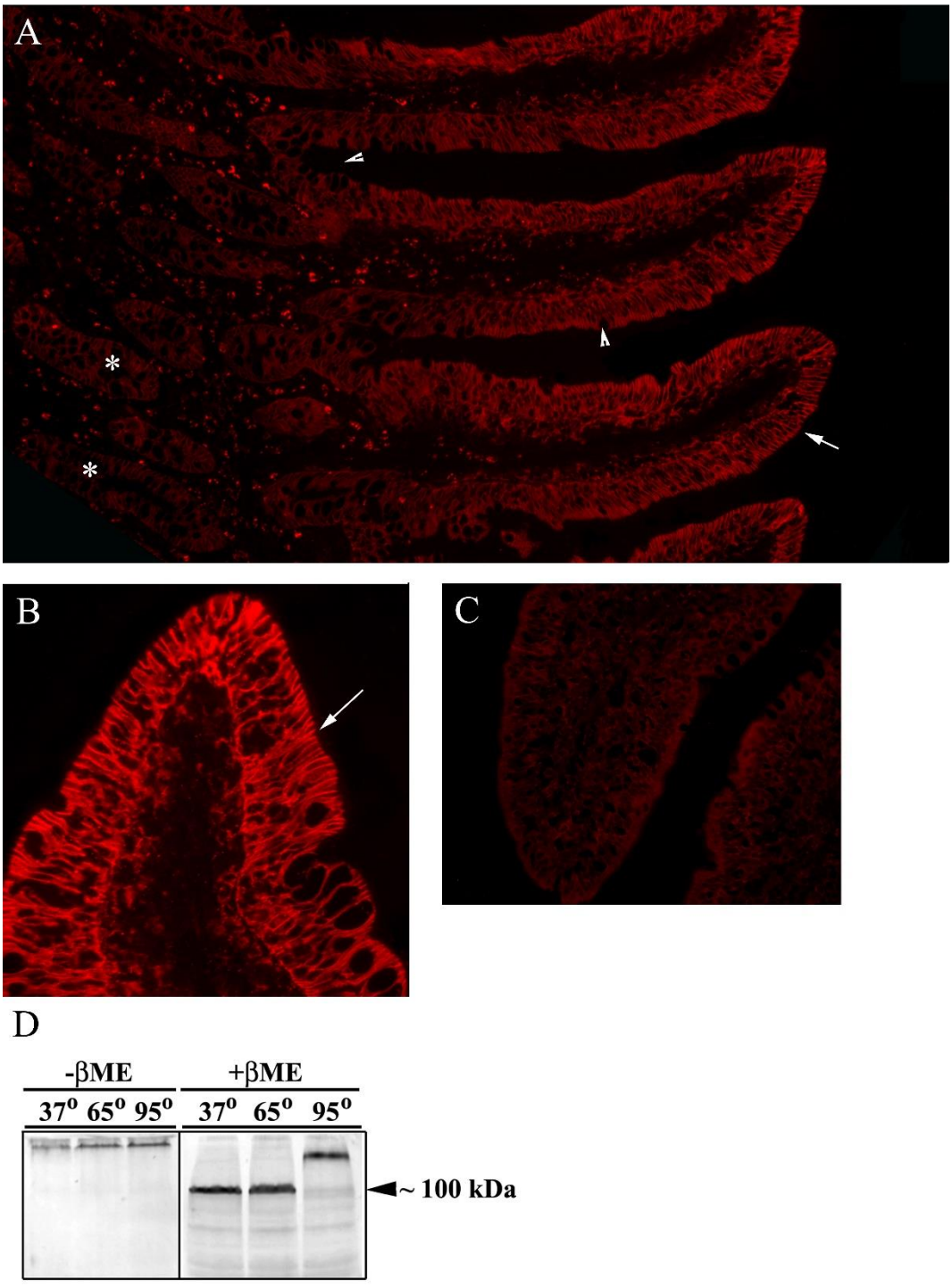
5.1. Određivanje optimalnih uvjeta za upotrebu protutijela razvijenih protiv Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu svinje

Kako bi se provjerila specifičnost i postigla što veća učinkovitost obilježavanja specifičnim protutijelima protiv Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2, ispitani su optimalni uvjeti za imunohistokemijske metode i *western*-analizu u tankom crijevu svinje.

5.1.1. Protutijelo protiv Na/K-ATPaze

Ispitivanje optimalnih uvjeta i postupaka otkrivanja antigena za imunohistokemijsku metodu na tkivnim narescima duodenuma, jejunuma i ileuma pokazalo je da protutijelo protiv Na/K-ATPaze najbolje rezultate daje kuhanjem u mikrovalnoj pećnici u citratnom puferu pH-vrijednosti 6,0. Prilikom provjere optimalnih koncentracija za primarno protutijelo protiv Na/K-ATPaze i sekundarnog DAM-CY3 protutijela, najspecifičnije bojenje s minimalnim pozadinskim bojenjem preparata bilo je prilikom korištenja razrjeđenja 1 : 400 i za primarno i za sekundarno protutijelo. Na tkivnim narescima jejunuma svinje (slike 5A i 5B) protutijelo protiv Na/K-ATPaze označilo je bazolateralne membrane enterocita, ali i bazolateralne membrane vrčastih stanica, dok je četkasta membrana ostala neobilježena. Lamina proprija crijevnih resica ostala je također neobilježena. Stanicama u kriptama jejunuma označene su bazolateralne membrane. Kada je sekundarno protutijelo korišteno bez prethodne inkubacije primarnim protutijelom, izostalo je bojenje bazolateralnih membrana enterocita, ali i vrčastih stanica i stanica u kriptama (slika 5C).

Uvjeti za *western*-analizu rađeni su u USM-u enterocita jejunuma kao središnjeg dijela tankog crijeva s očekivanom izraženošću Na/K-ATPaze. Za *western*-analizu uzorci USM-a denaturirani su zagrijavanjem na različitim temperaturama bez reducirajućih uvjeta (-β-ME) ili u reducirajućim uvjetima (+β-ME). Uzorci pripremljeni bez β-ME i pri svim temperaturama pokazali su slabu ili nikakvu proteinsku prugu od ~100 kDa, što odgovara proteinu Na/K-ATPaze. U reducirajućim uvjetima, uz dodatak β-ME, protutijelo protiv Na/K-ATPaze je pak ovisno o temperaturi dobro obilježilo proteinsku prugu od ~100 kDa u USM-u enterocita jejunuma (slika 5D). U uzorku jejunuma proteinska pruga bila je najsnažnija nakon obrade USM-a pri 65 ºC tijekom 15 minuta. Inkubacija uzoraka samo u sekundarnom protutijelu, bez prethodne inkubacije u primarnom protutijelu protiv Na/K-ATPaze, nije pokazala specifičnu proteinsku prugu. Navedeni optimalni uvjeti korišteni su u svim daljnjim pokusima.

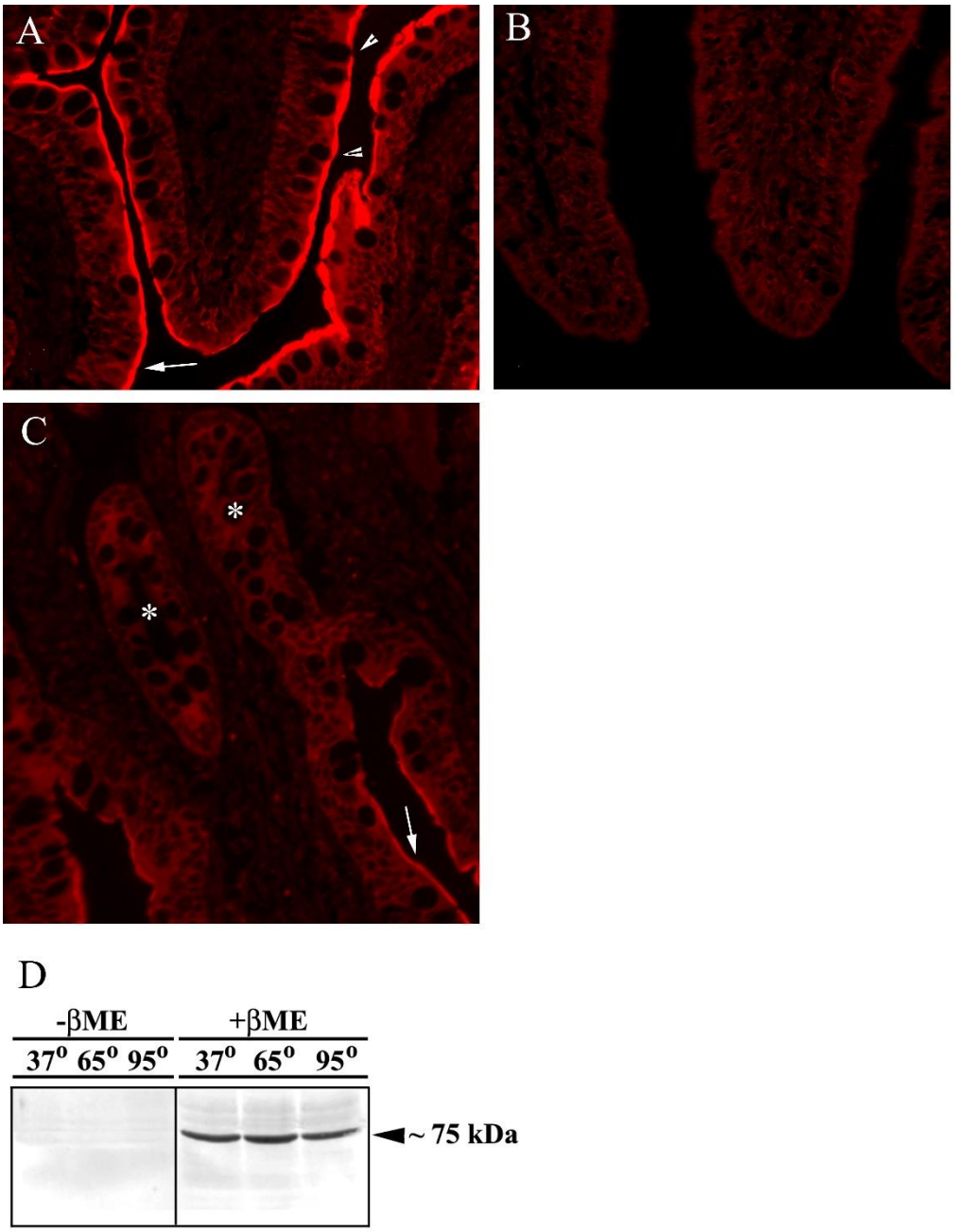


Slika 5. Imunohistokemijska karakterizacija protutijela protiv Na/K-ATPaze u jejunumu svinje. Protutijelo je u jejunumu obilježilo bazolateralne membrane enterocita (A i B, strelica), stanica u kriptama (A, zvjezdice) i vrčastih stanica (A, vršci strelica). Inkubacija tkivnih narezaka samo u sekundarnom protutijelu nije pokazala specifično bojenje (C). Uvjeti za *western*-analizu rađeni u USM enterocita jejunuma s vidljivom proteinskom prugom od ~100 kDa koja odgovara Na/K-ATPazi (D).

5.1.2. Protutijelo protiv SGLT1

Poput Na/K-ATPaze, ispitivanje optimalnih uvjeta i postupaka otkrivanja antigena za imunohistokemijsku metodu na tkivnim narescima duodenuma, jejunuma i ileuma pokazalo je da protutijelo protiv SGLT1 najbolje rezultate daje termičkom obradom u mikrovalnoj pećnici u citratnom puferu pH-vrijednosti 6,0. Provjerom optimalnih koncentracija za primarno protutijelo protiv SGLT1 i sekundarnog GAR-CY3 protutijela utvrđeno je najspecifičnije bojenje tkivnih narezaka prilikom korištenja razrjeđenja 1 : 200 za primarno protutijelo i 1 : 500 za sekundarno protutijelo. Na tkivnim narescima jejunuma svinje protutijelo protiv SGLT1 označilo je četkaste membrane enterocita, dok su vršne membrane vrčastih stanica, stanice u kriptama, ali i lamina proprija crijevnih resica ostale neobilježene (slike 6A i 6C). Tkivni naresci jejunuma inkubirani samo sa sekundarnim protutijelom nisu pokazivali nikakvo bojenje (slika 6B).

Uvjeti za *western*-analizu rađeni su u USM-u enterocita jejunuma gdje je očekivana najjača izraženost SGLT1 u svinja (VAN DER WIELEN i sur., 2014). Uzorci USM-a enterocita jejunuma denaturirani su zagrijavanjem na različitim temperaturama bez reducirajućih uvjeta ili u njima. Slično kao i kod Na/K-ATPaze, uzorci pripremljeni bez β-ME i pri svim temperaturama nisu pokazali proteinsku prugu od ~75 kDa, što odgovara proteinu SGLT1. Pripremom USM-a enterocita jejunuma u reducirajućim uvjetima, uz dodatak β-ME, protutijelo protiv SGLT1 je jasno, iako slabog intenziteta, obilježilo proteinsku prugu od ~75 kDa (slika 6D). U uzorku jejunuma proteinska pruga koja odgovara SGLT1 bila je najizraženija nakon obrade USM-a pri 65 ºC tijekom 15 minuta. Inkubacija uzoraka samo u sekundarnom protutijelu nije pokazala specifičnu proteinsku prugu za SGLT1. Navedeni optimalni uvjeti korišteni su u daljnjim pokusima s protutijelom protiv SGLT1.

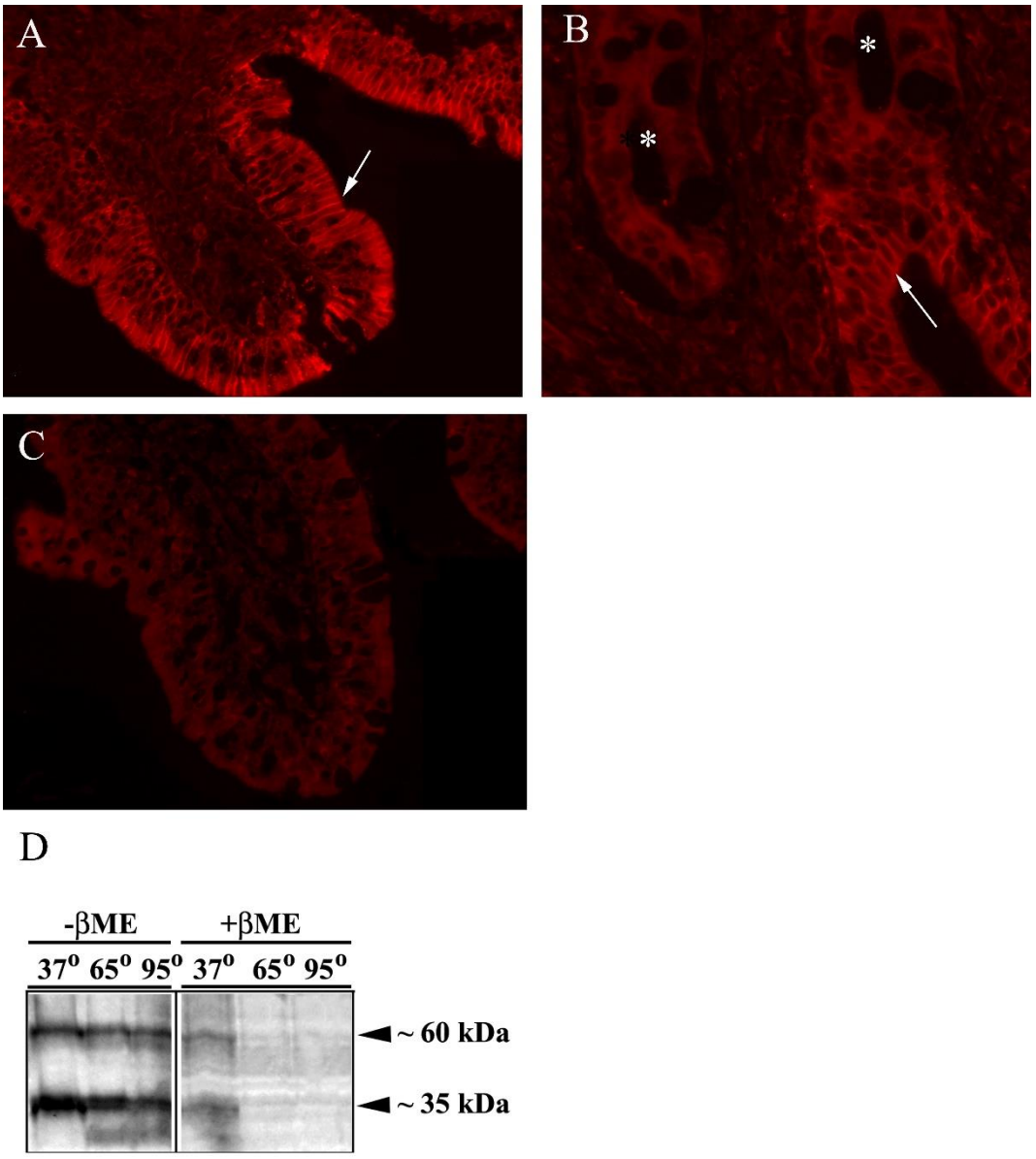


Slika 6. Imunohistokemijska karakterizacija protutijela protiv SGLT1 u jejunumu svinje. Protutijelo je u jejunumu obilježilo četkaste membrane enterocita (A i C, strelica), dok stanice u kriptama (C, zvjezdice) i vrčaste stanice (A, vršci strelica) nisu pokazale vidljivu fluorescenciju. Inkubacija tkivnih narezaka samo u sekundarnom protutijelu nije pokazala specifično bojenje (B). Uvjeti za *western*-analizu rađeni u USM-u enterocita jejunuma s vidljivom proteinskom prugom od ~75 kDa koja odgovara SGLT1 (D).

5.1.3. Protutijelo protiv GLUT2

Protutijelo protiv GLUT2, isto kao i protutijelo protiv Na/K-ATPaze i SGLT1, nakon ispitivanja optimalnih uvjeta i postupaka otkrivanja antigena za imunohistokemijsku metodu na tkivnim narescima duodenuma, jejunuma i ileuma pokazalo je najbolje bojenje kuhanjem u mikrovalnoj pećnici u citrantnom puferu pH-vrijednosti 6,0. Provjerom optimalnih koncentracija primarnog protutijela protiv GLUT2 i sekundarnog DAG-CY3, uočeno je najspecifičnije bojenje prilikom razrjeđenja 1 : 200 za primarno protutijelo i 1 : 400 za sekundarno protutijelo. Na tkivnim narescima jejunuma svinje (slike 7A i 7B) protutijelo protiv GLUT2 označilo je bazolateralne membrane enterocita, dok četkaste membrane enterocita nisu označene. Lamina proprija crijevnih resica, kao i stanice u kriptama nisu označene. Inkubacija u sekundarnom protutijelu, bez prethodne inkubacije u primarnom protutijelu, nije pokazala specifično bojenje na tkivnim narescima (slika 7C).

Na USM-u enterocita jejunuma rađeni su uvjeti za *western*-analizu zbog očekivane najjače izraženosti (ZUO i sur., 2010), koji su zatim denaturirani zagrijavanjem kroz određeni period na različitim temperaturama bez reducirajućih uvjeta ili u njima. Iako je protutijelo protiv GLUT2 obilježilo proteinske pruge, očekivanu na ~60 kDa i dodatnu deglikoziliranu na ~35 kDa, i bez i s dodatkom β-ME, proteinske pruge bez β-ME nejasnog su obrisa. U reducirajućim uvjetima proteinske pruge na ~60 kDa i ~35 kDa jasnijeg su izgleda u USM-u jejunuma (slika 7D). U uzorku jejunuma proteinska pruga bila je najjasnija nakon obrade USM-a pri 65 ºC tijekom 15 minuta. Inkubacija uzoraka samo sekundarnim protutijelom nije pokazala specifičnu proteinsku prugu za GLUT2.



Slika 7. Imunohistokemijska karakterizacija protutijela protiv GLUT2 u jejunumu svinje. Protutijelo je u jejunumu obilježilo bazolateralne membrane enterocita (A i B, strelica), dok stanice u kriptama (B, zvjezdice) nisu pokazale vidljivu fluorescenciju. Inkubacija tkivnih narezaka samo u sekundarnom protutijelu nije pokazala specifično bojenje (C). Uvjeti za *western*-analizu rađeni u USM-u enterocita jejunuma s vidljivom proteinskom prugom od ~60 kDa koja odgovara GLUT2 i dodatnom deglikoliziranom proteinskom prugom od ~35 kDa (D).

5.2. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankom crijevu svinje

5.2.1. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na proteinskoj razini

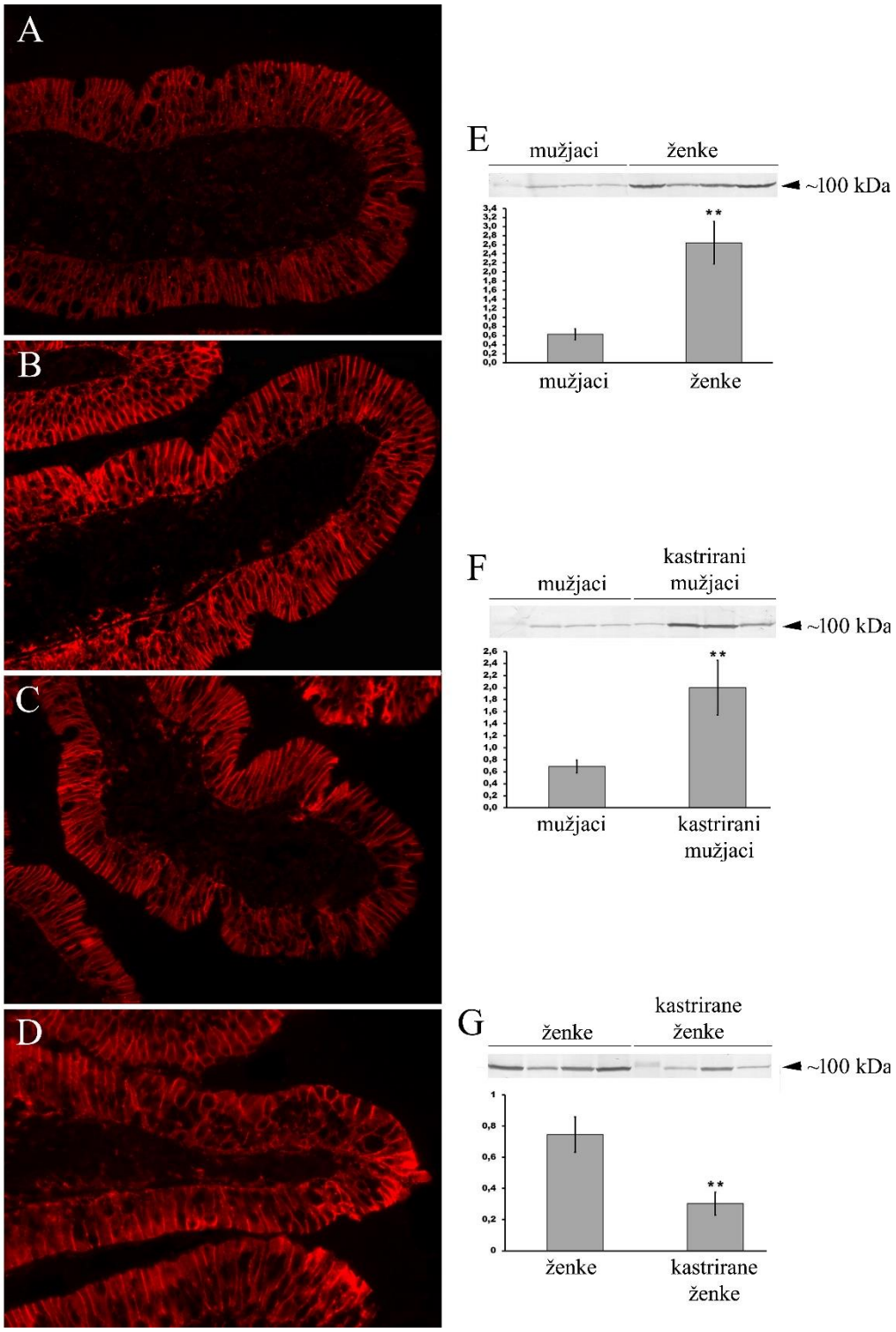
U tkivnim narescima duodenuma (slika 8) i jejunuma (slika 9) vidljive su spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATPaze na bazolateralnim membranama enterocita, ali i u stanicama u kriptama crijeva, dok spolna razlika nije uočena na bazolateralnim membranama enterocita u ileumu (slika 10).

Bazolateralne membrane enterocita u duodenumu mužjaka (slika 8A) pokazuju znatno slabiji intenzitet fluorescencije nego u ženki (slika 8B) i kastriranih mužjaka (slika 8C). U usporedbi s intenzitetom fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita duodenuma kod ženki, intenzitet fluorescencije bazolateralnih membrana kod kastriranih ženki (slika 8D) bio je slabiji. *Western*-analizom potvrđen je nalaz imunohistokemijskom metodom. Proteinske pruge od ~100 kDa, koje odgovaraju Na/K-ATPazi, u USM iz enterocita duodenuma ženki (slika 8E) i kastriranih mužjaka (slika 8F) bile su jače nego u mužjaka te je denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga utvrđena statistički značajna razlika u korist ženki, pri čemu su vrijednosti u ženki otprilike 3,5 puta veće, i kastriranih mužjaka, kod kojih su vrijednosti otprilike tri puta veće nego vrijednosti u mužjaka. Proteinske pruge od ~100 kDa iz USM-a enterocita duodenuma ženki bile su jače izražene nego u kastriranih ženki (slika 8G) te je denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga utvrđena statistički značajna razlika u korist ženki, pri čemu su vrijednosti u ženki otprilike 2,5 puta veće nego vrijednosti u kastriranih ženki.

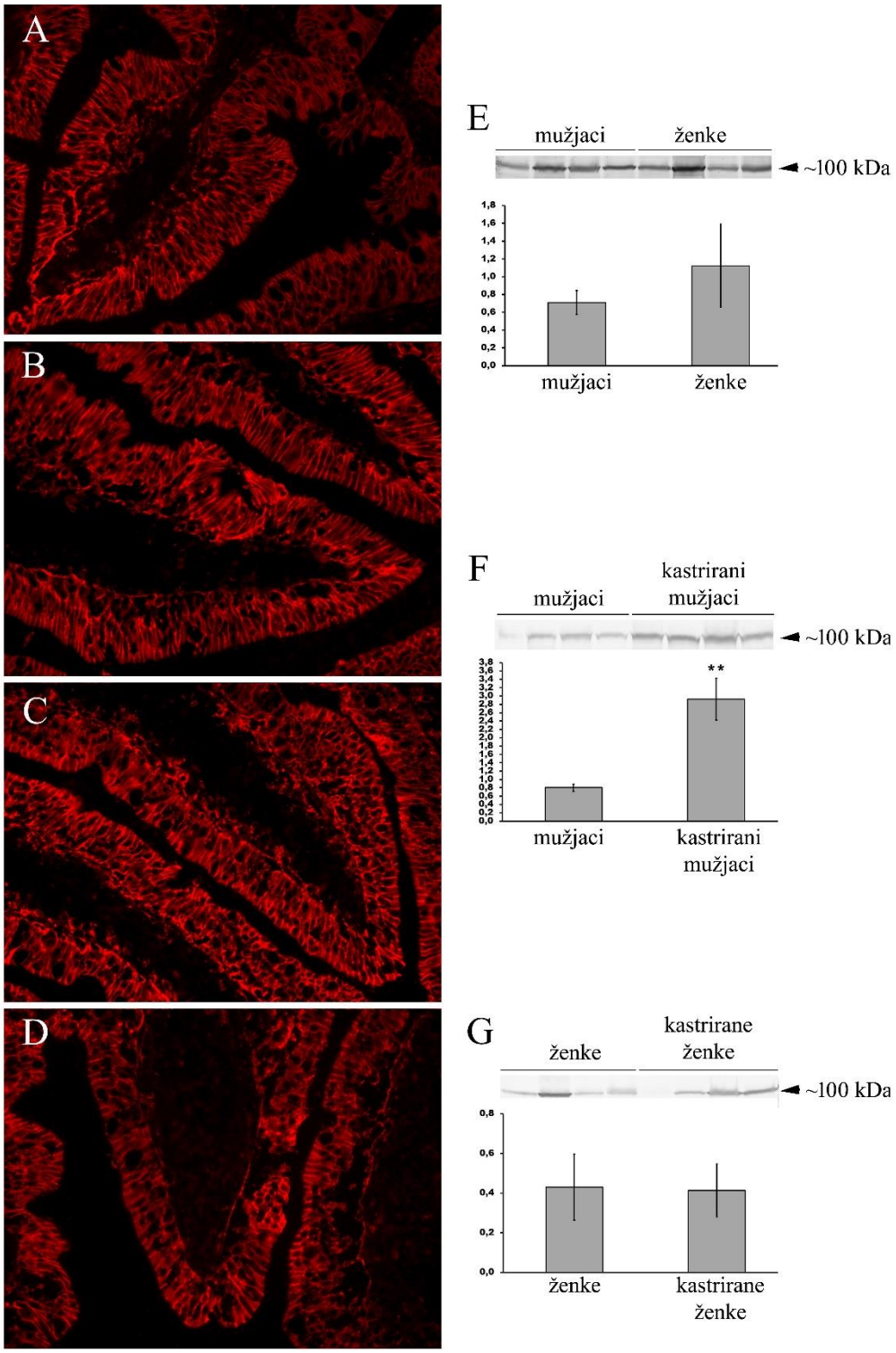
Na tkivnim narescima jejunuma bazolateralne membrane enterocita mužjaka (slika 9A) pokazivale su blago slabiji intenzitet fluorescencije nego u ženki (slika 9B) i značajno slabiji intenzitet fluorescencije nego u kastriranih mužjaka (slika 9C). Razlika u intenzitetu fluorescencije između ženki i kastriranih ženki (slika 9D) nije uočena. Proteinske pruge od ~100 kDa iz USM-a enterocita mužjaka i ženki (slika 9E) nisu pokazivale razlike u jačini izražaja, što je i potvrđeno denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga. Uočljiva razlika u jačini izražaja proteinskih pruga uočena je između mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 9F) u korist kastriranih mužjaka te je statistički značajna razlika potvrđena i denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga kojim su utvrđene vrijednosti u kastriranih mužjaka otprilike 3,5 puta veće nego u mužjaka. Izostanak razlike u intenzitetu fluorescencije bazolateralnih membrana

enterocita između ženki i kastriranih ženki odrazila se i na izostanak razlike u jačini izražaja proteinskih pruga koja je potvrđena i denzitometrijskim mjerenjem (slika 9G).

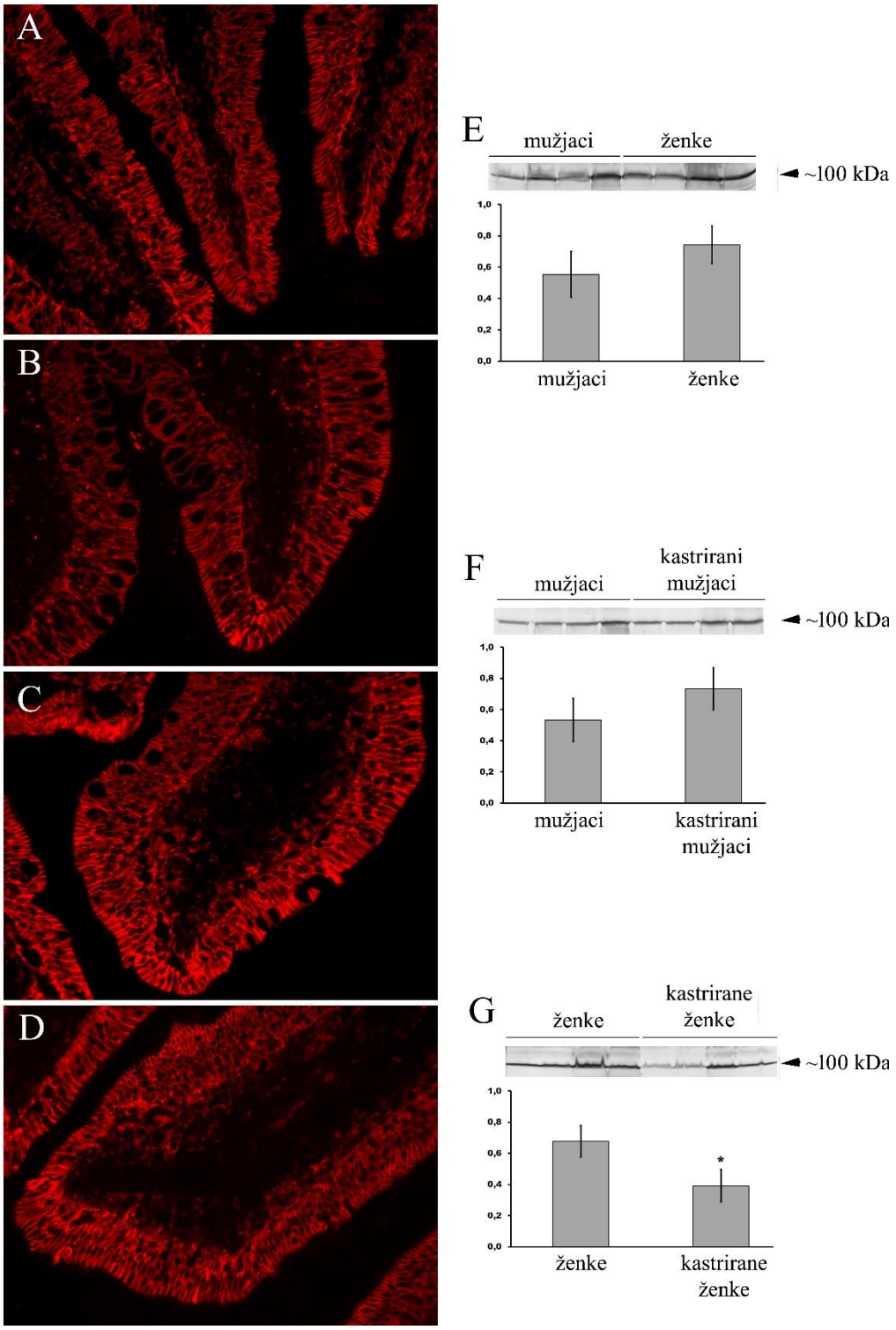
Razlike u intenzitetu fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita na tkivnim narescima ileuma nisu uočljive između mužjaka (slika 10A), ženki (slika 10B) i kastriranih mužjaka (slika 10C), dok je intenzitet fluorescencije u kastriranih ženki (slika 10D) neznatno slabiji nego u ženki. *Western*-analizom USM-a enterocita ileuma potvrđen je imunohistokemijski nalaz. Izostanak razlika u jačini proteinskih pruga od ~100 kDa uočen je između mužjaka i ženki (slika 10E), potvrđen i denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga, te između mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 10F), također potvrđen denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga. Neznatno slabiji intenzitet fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita, uočen kod kastriranih ženki, potvrđen je *western*-analizom kojom je vidljivo da je jačina proteinskih pruga jača kod ženki nego u kastriranih ženki, i to otprilike dva puta (slika 10G).



Slika 8. Spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATP-aze u duodenumu svinje. Protutijelo protiv Na/K-ATPaze slabije je obilježilo bazolateralne membrane enterocita mužjaka (A) nego u ženki (B) i kastriranih mužjaka (C), dok je kod ženki jače obilježilo nego u kastriranih ženki (D). Proteinske pruge od ~100 kDa dobivene *western*-analizom slabije su izražene u mužjaka nego u ženki (E) i kastriranih mužjaka (F), dok su ženke imale jače izraženu proteinsku prugu nego kastrirane ženke (G). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



Slika 9. Spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATP-aze u jejunumu svinje. Protutijelo protiv Na/K-ATPaze blago je slabije obilježilo bazolateralne membrane enterocita mužjaka (A) nego u ženki (B) i kastriranih mužjaka (C), dok između ženki i kastriranih ženki (D) nije uočena razlika u fluorescenciji. Proteinske pruge od ~100 kDa, dobivene *western*-analizom, ne pokazuju razliku u jačini između mužjaka i ženki (E) te ženki i kastriranih ženki (G). Značajno slabiju jačinu proteinskih pruga imali su mužjaci u usporedbi s kastriranim mužjacima (F). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



Slika 10. Spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATP-aze u ileumu svinje. Jačina fluorescencije Na/K-ATPaze u ileumu nije pokazala razlike između mužjaka (A), ženki (B) i kastriranih mužjaka (C), dok je između ženki i kastriranih ženki (D) uočena blaga razlika u fluorescenciji u korist ženki. Proteinske pruge od ~100 kDa, dobivene *western*-analizom, ne pokazuju razliku u jačini između mužjaka i ženki (E) te mužjaka i kastriranih mužjaka (F). Značajno jaču izraženost proteinskih pruga imale su ženke u usporedbi s kastriranim ženkama (G). Zvjezdica (*) $p < 0,05$.

5.2.2. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na proteinskoj razini

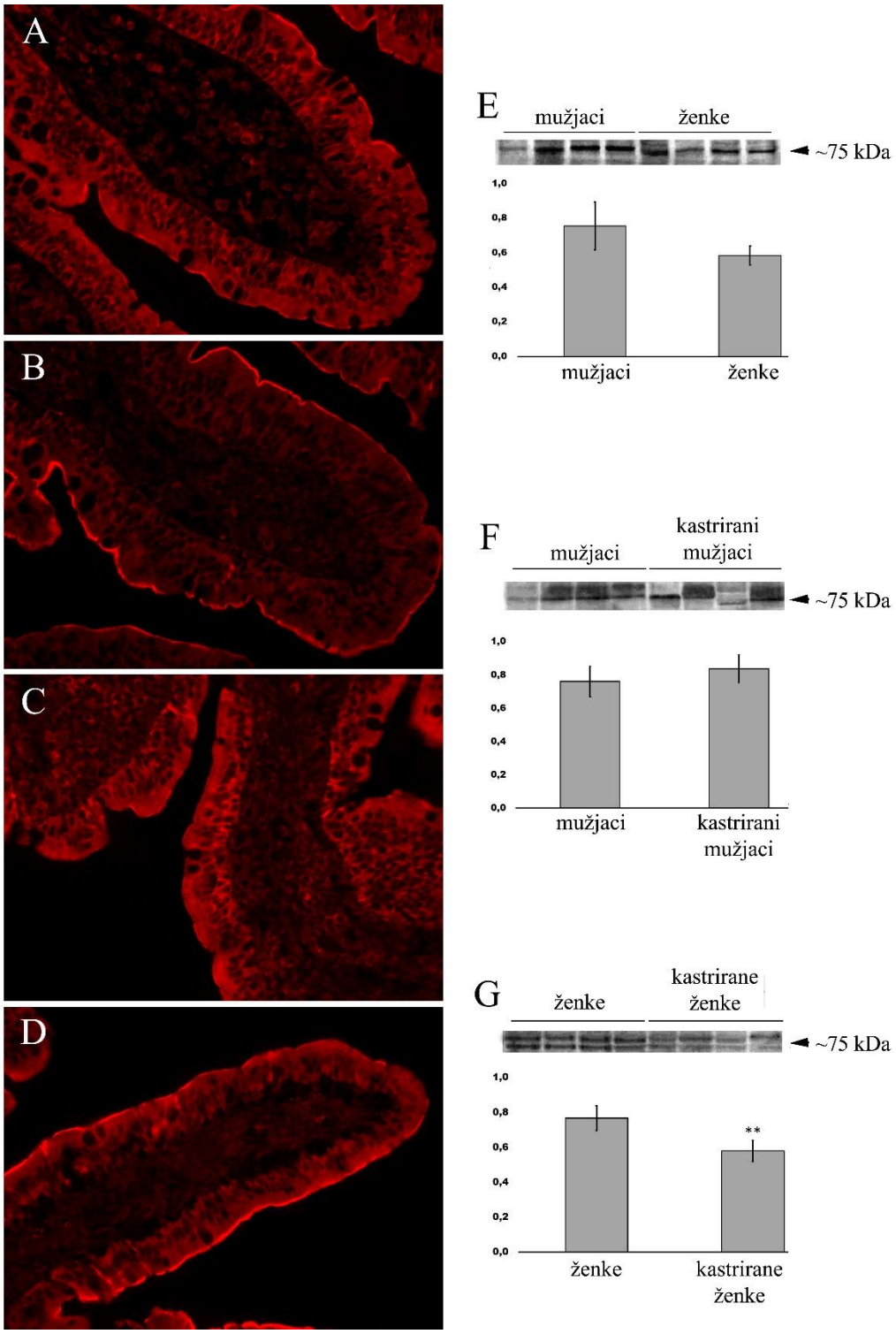
U tkivnim narescima duodenuma (slika 11), jejunuma (slika 12) i ileuma (slika 13) nisu uočljive izražene spolne razlike u izraženosti proteina SGLT1 na četkastim membranama enterocita.

Četkaste membrane enterocita u duodenumu mužjaka (slika 11A) pokazuju blago slabiji intenzitet fluorescencije nego u ženki (slika 11B) i kastriranih mužjaka (slika 11C), dok je intenzitet fluorescencije četkastih membrana enterocita ženki blago jači nego u kastriranih ženki (slika 11D). *Western*-analizom USM-a enterocita duodenuma utvrđeno je da unatoč blagoj razlici u intenzitetu fluorescencije četkastih membrana enterocita između mužjaka i ženki te mužjaka i kastriranih mužjaka, proteinske pruge od ~75 kDa, koje odgovaraju SGLT1, ne pokazuju razlike u jačini između mužjaka i ženke (slika 11E) te mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 11F). Iako su proteinske pruge od ~75 kDa bile vrlo slabog intenziteta u svim uzorcima iz USM-a enterocita duodenuma, denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga nije dokazana razlika u jačini proteinskih pruga između mužjaka i ženki te mužjaka i kastriranih mužjaka. Iako blaga, ali uočljiva razlika između ženki i kastriranih ženki u jačini proteinskih pruga od ~75 kDa u korist ženki (slika 11G), denzitometrijsko mjerenje proteinskih pruga pokazalo je statistički značajnu razliku u korist ženki, koje su imale otprilike 1,5 puta jaču izraženost.

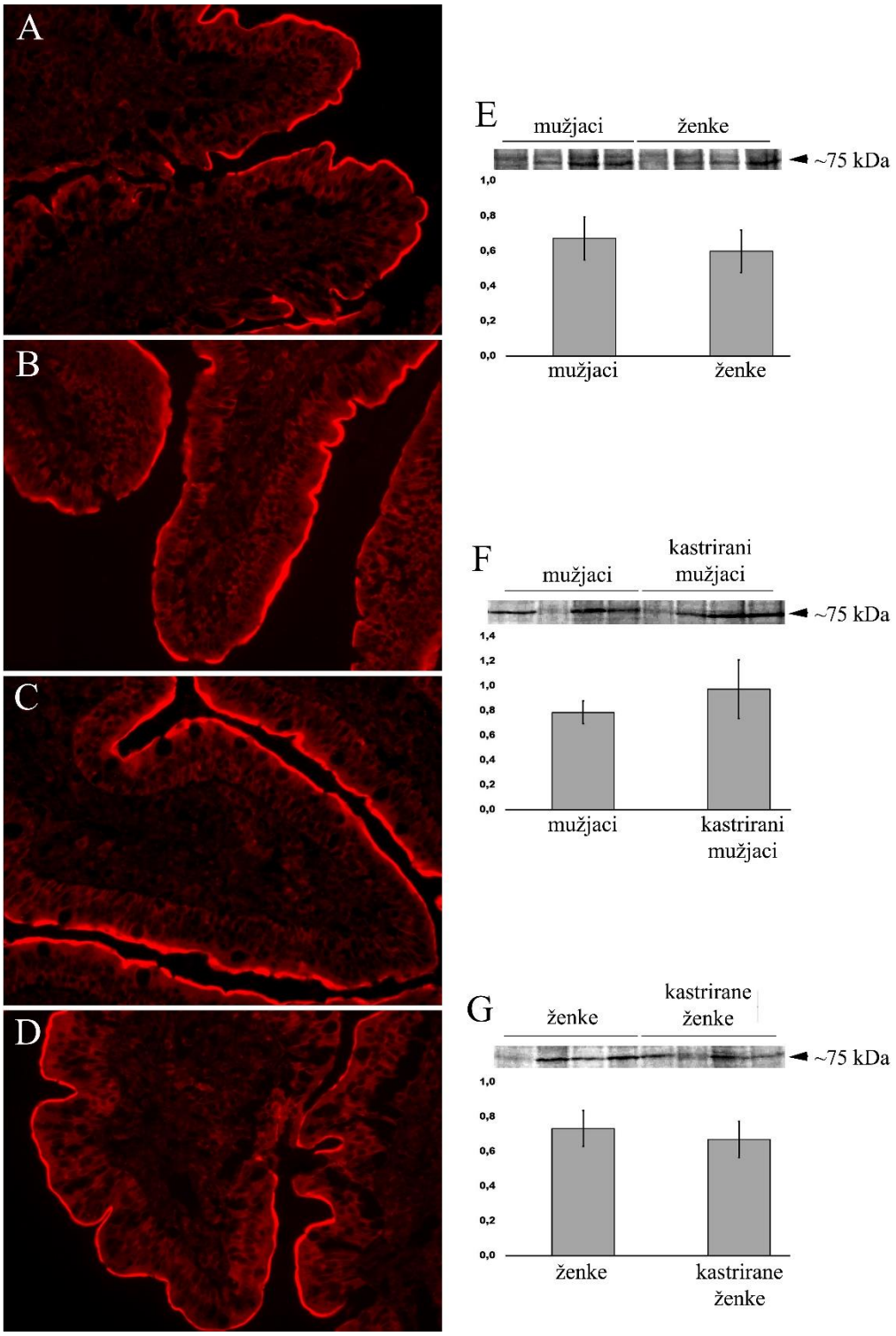
Na tkivnim narescima jejunuma, četkaste membrane enterocita mužjaka (slika 12A) ne pokazuju razliku u intenzitetu fluorescencije naspram ženki (slika 12B), dok je intenzitet fluorescencije kod mužjaka blago slabiji nego u kastriranih mužjaka (slika 12C). Razlika u intenzitetu fluorescencije između ženki i kastriranih ženki (slika 12D) nije uočena. Jačine proteinskih pruga od ~75 kDa, dobivene *western*-analizom USM-a enterocita jejunuma, ne pokazuju uočljivu razliku između skupina (slike 12E – 12G). Denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga potvrđeno je da nema statistički značajne razlike u jačini proteinskih pruga između skupina.

Jačina fluorescencije na četkastim membranama na tkivnim narescima ileuma mužjaka (slika 13A) pokazuje blago jači intenzitet nego u ženki (slika 13B), dok razlike u intenzitetu fluorescencije između mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 13C) te ženki i kastriranih ženki (slika 13D) nisu vidljive. *Western*-analizom USM-a enterocita ileuma potvrđen je

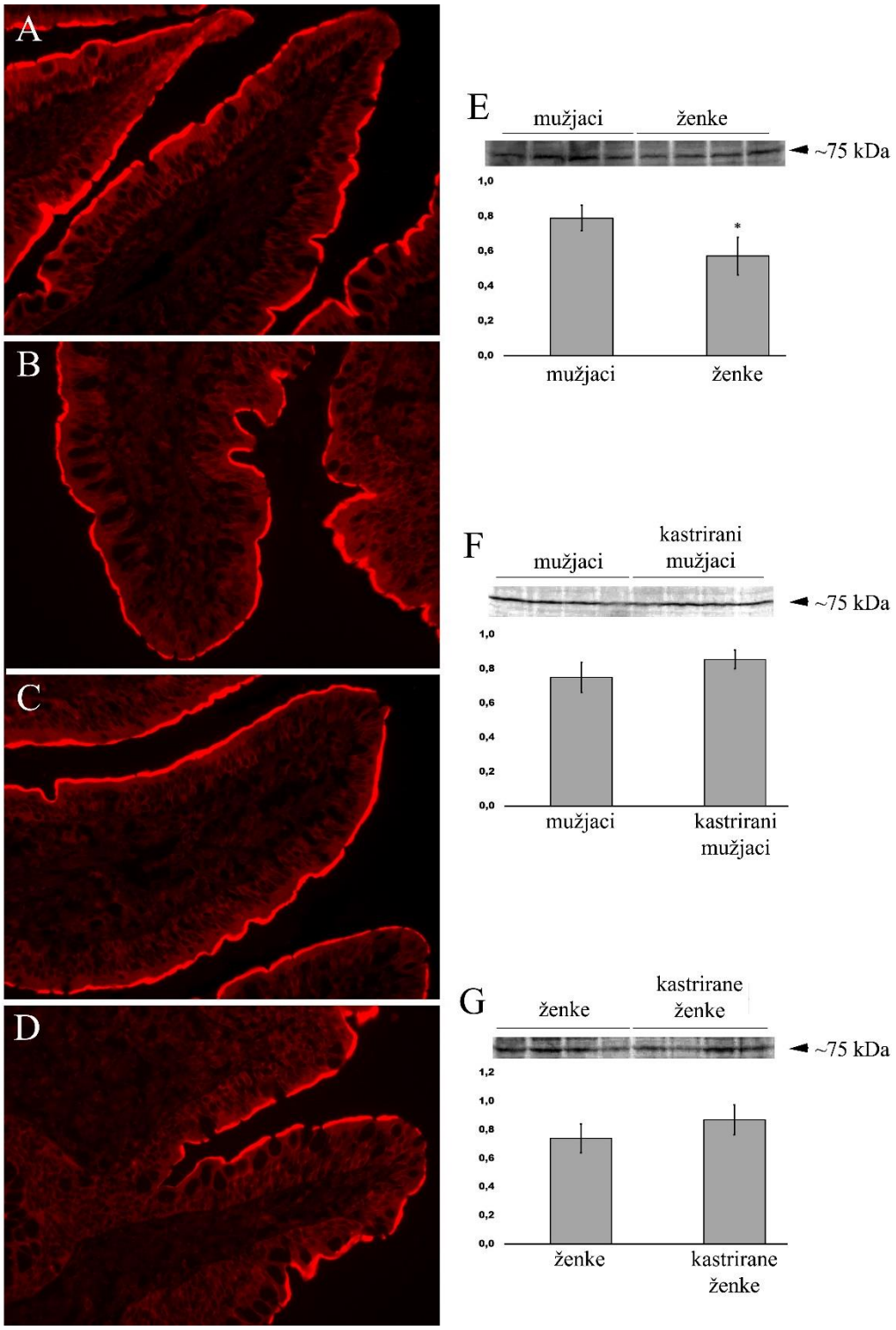
imunohistokemijski nalaz. Proteinske pruge od ~75 kDa, koje odgovaraju proteinu SGLT1, u uzorcima USM-a ileuma bile su općenito jačeg izražaja od proteinskih pruga USM-a duodenuma i ileuma. Proteinske pruge od ~75 kDa u mužjaka otprilike su 1,5 puta jače izražene nego u ženki (slika 13E), što je i potvrđeno denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga. Uočljive razlike u jačini proteinskih pruga između mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 13F) te ženki i kastriranih ženki (slika 13G) nema, što je i potvrđeno denzitometrijskim mjerenjima proteinskih pruga.



Slika 11. Spolne razlike u izraženosti proteina SGLT1 u duodenumu svinje. Jačina fluorescencije SGLT1 u duodenumu nije pokazala razlike između mužjaka (A), ženki (B) i kastriranih mužjaka (C), dok je između ženki i kastriranih ženki (D) uočena blaga jača fluorescencija u korist ženki. Proteinske pruge od ~75 kDa, dobivene *western*-analizom, ne pokazuju razliku u jačini između mužjaka i ženki (E) te mužjaka i kastriranih mužjaka (F). Značajno jaču izraženost proteinskih pruga imale su ženke u usporedbi s kastriranim ženkama (G). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



Slika 12. Spolne razlike u izraženosti proteina SGLT1 u jejunumu svinje. Jačina fluorescencije SGLT1 u jejunumu nije pokazala razlike između mužjaka (A), ženki (B), kastriranih mužjaka (C) i kastriranih ženki (D). Proteinske pruge od ~75 kDa, dobivene *western*-analizom, ne pokazuju razliku u jačini između skupina (E – G).



Slika 13. Spolne razlike u izraženosti proteina SGLT1 u ileumu svinje. Jačina fluorescencije SGLT1 u ileumu u mužjaka (A) bila je blago jača nego u ženki (B). Kastracija nije imala utjecaja na jačinu fluorescencije (C i D). Proteinske pruge od ~75 kDa, dobivene *western*-analizom, pokazuju jedino razliku u jačini između mužjaka i ženki (E) u korist mužjaka, dok kastracija, kao i u imunohistokemiji, nije imala utjecaja (F i G). Zvjezdica (*) $p < 0,05$.

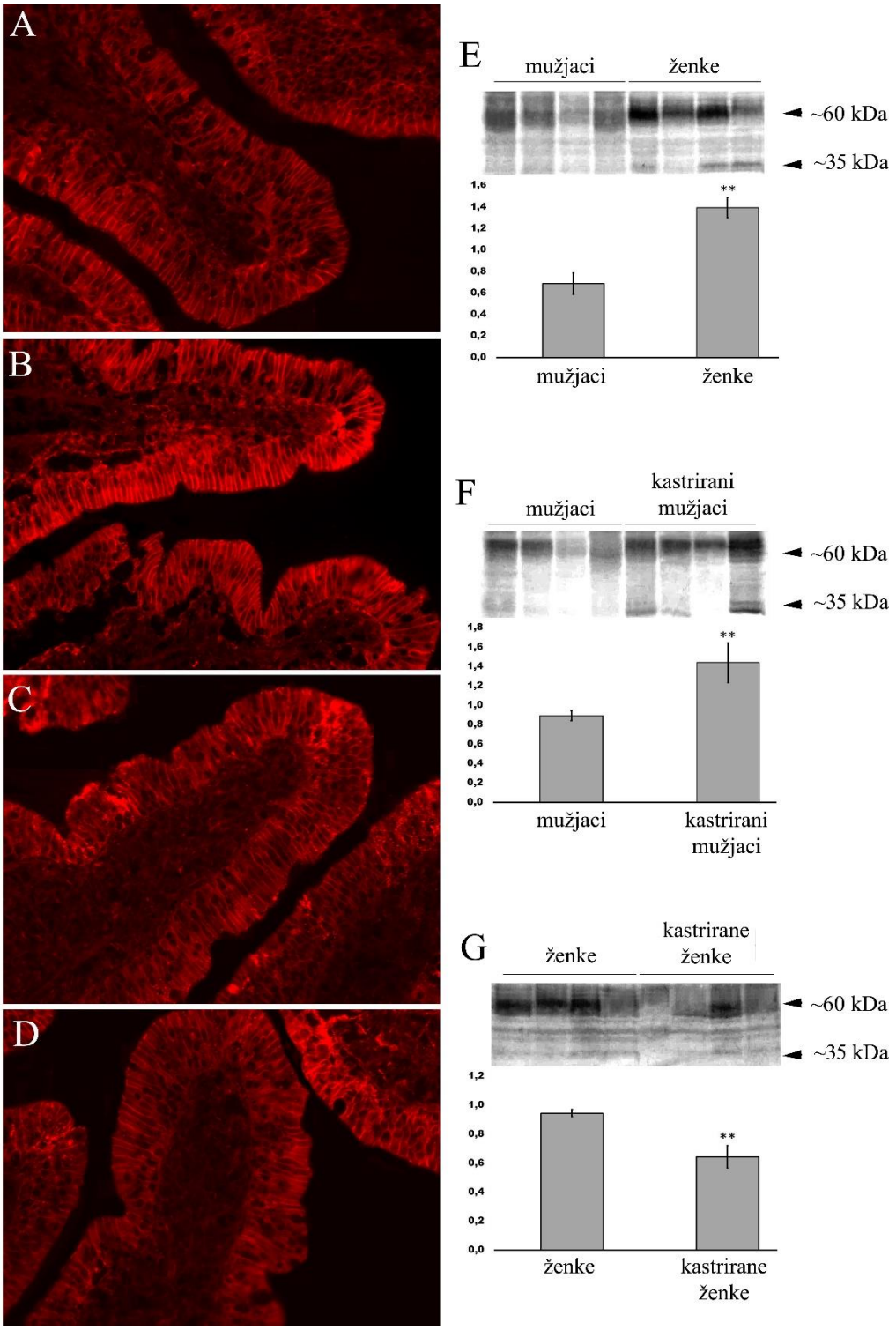
5.2.3. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na proteinskoj razini

U tkivnim narescima duodenuma (slika 14) i jejunuma (slika 15) uočljive su spolne razlike u izraženosti proteina GLUT2 na bazolateralnim membranama enterocita, dok spolne razlike nisu uočene na tkivnim narescima ileuma (slika 16).

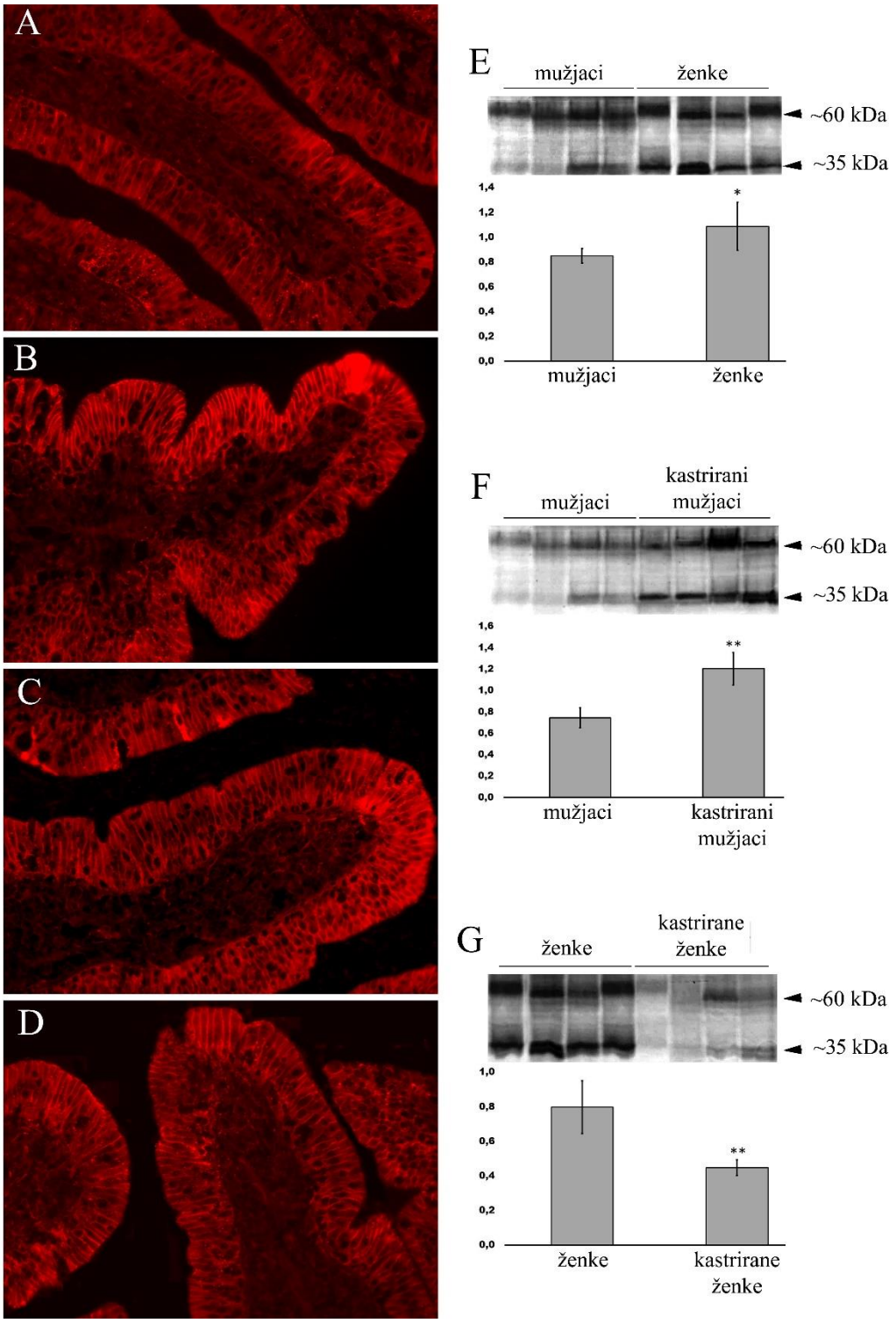
Na tkivnim narescima duodenuma mužjaka (slika 14A) bazolateralne membrane pokazuju slabiji intenzitet fluorescencije nego u ženki (slika 14B) i kastriranih mužjaka (slika 14C), dok je intenzitet fluorescencije bazolateralnih membrana ženki jači nego u kastriranih ženki (slika 14D). Jačina proteinskih pruga od ~60 kDa i ~35 kDa, što odgovara proteinu GLUT2, dobivenih *western*-analizom USM-a enterocita duodenuma mužjaka, vidljivo su slabije izraženi od proteinskih pruga ženki (slika 14E) te je denzitometrijskim mjerenjem jačine proteinskih pruga utvrđeno da je izraženost u mužjaka dva puta slabija nego u ženki. Proteinske pruge iz USM-a enterocita duodenuma mužjaka slabije su izražene i od proteinskih pruga kastriranih mužjaka (slika 14F), i to za otprilike 1,5 puta. Proteinske pruge od ~60 kDa i ~35 kDa ženki jače su izražene nego u kastriranih ženki (slika 14G) za 1,5 puta, što je potvrđeno i denzitometrijskim mjerenjem.

Slično nalazu u duodenumu, u jejunumu su bazolateralne membrane na tkivnim narescima mužjaka (slika 15A) pokazale slabiji intenzitet fluorescencije nego u ženki (slika 15B) i kastriranih mužjaka (slika 15C), dok su ženke pak imale jači intenzitet fluorescencije nego kastrirane ženke (slika 15D). Jačine proteinskih pruga od ~60 kDa i ~35 kDa u mužjaka slabije su bile izražene nego u ženki (slika 15E) i kastriranih mužjaka (slika 15F). Denzitometrijskim mjerenjem izraženosti proteinskih pruga utvrđeno je da je izraženost u mužjaka manja otprilike 1,3 puta nego u ženki i 1,5 puta nego u kastriranih mužjaka. Jačina proteinskih pruga dobivenih *western*-analizom USM-a enterocita jejunuma ženki jača je nego u kastriranih ženki (slika 15G), i to za otprilike 1,8 puta.

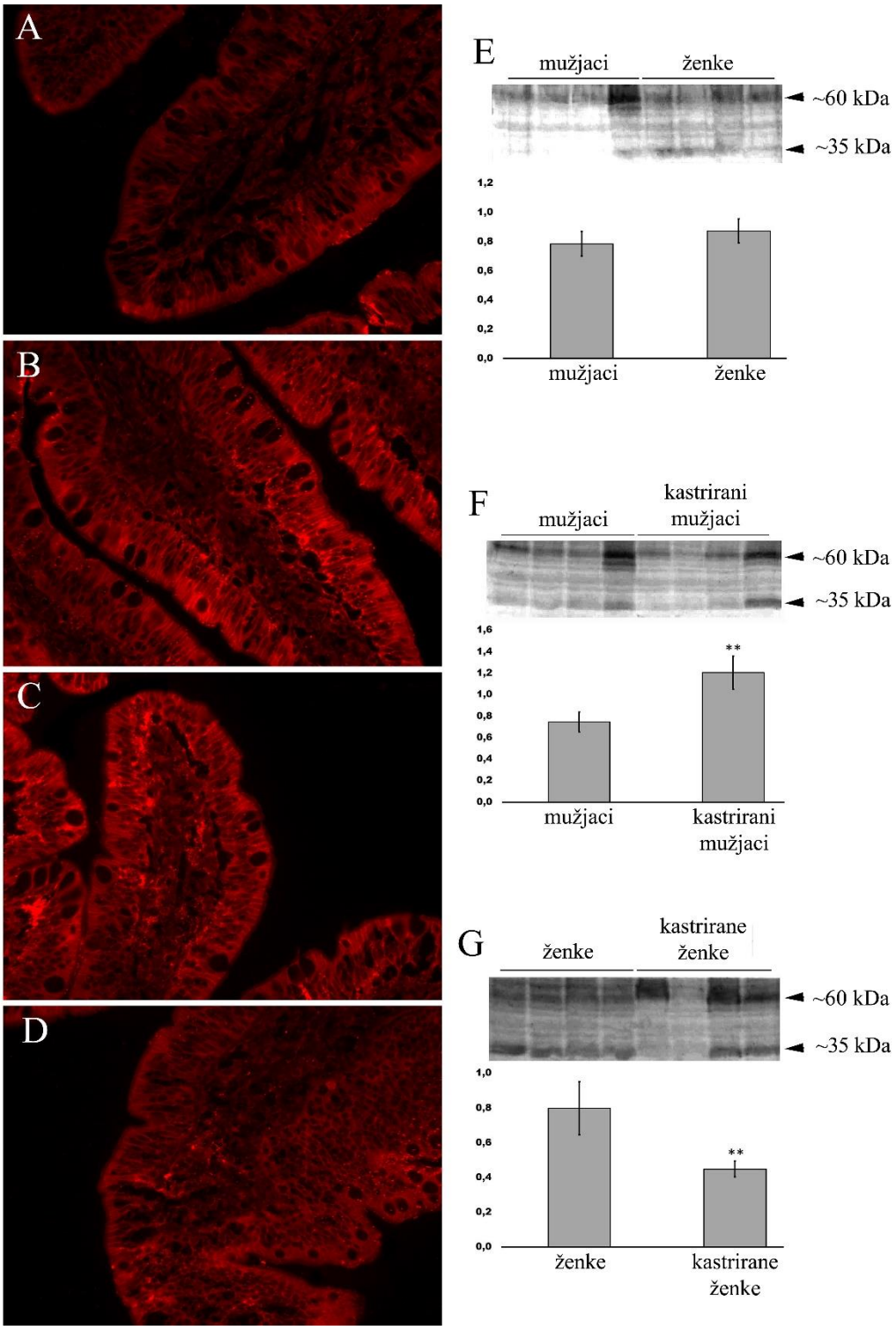
Spolne razlike u intenzitetu fluorescencije bazolateralnih membrana na tkivnim narescima ileuma nisu uočene između skupina (slika 16A – 16D). Proteinske pruge od ~60 kDa i ~35 kDa dobivene *western*-analizom iz USM-a enterocita ileuma također ne pokazuju uočljivu razliku u izraženosti među skupinama (slike 16E – 16G), što je i potvrđeno denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga.



Slika 14. Spolne razlike u izraženosti proteina GLUT2 u duodenumu svinje. Protutijelo protiv GLUT2 slabije je obilježilo bazolateralne membrane enterocita mužjaka (A) nego u ženki (B) i kastriranih mužjaka (C), dok je kod ženki jače obilježilo nego u kastriranih ženki (D). Proteinske pruge od ~60 kDa i ~35 kDa, dobivene *western*-analizom, slabije su izražene u mužjaka nego u ženki (E) i kastriranih mužjaka (F), dok su ženke imale jače izraženu proteinsku prugu nego kastrirane ženke (G). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



Slika 15. Spolne razlike u izraženosti proteina GLUT2 u jejunumu svinje. Protutijelo protiv GLUT2 slabije je obilježilo bazolateralne membrane enterocita mužjaka (A) nego u ženki (B) i kastriranih mužjaka (C), dok je kod ženki jače obilježilo nego u kastriranih ženki (D). Proteinske pruge od ~60 kDa i ~35 kDa, dobivene *western*-analizom, slabije su izražene u mužjaka nego u ženki (E) i kastriranih mužjaka (F), dok su ženke imale jače izraženu proteinsku prugu nego kastrirane ženke (G). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$. Zvjezdica (*) $p < 0,05$.



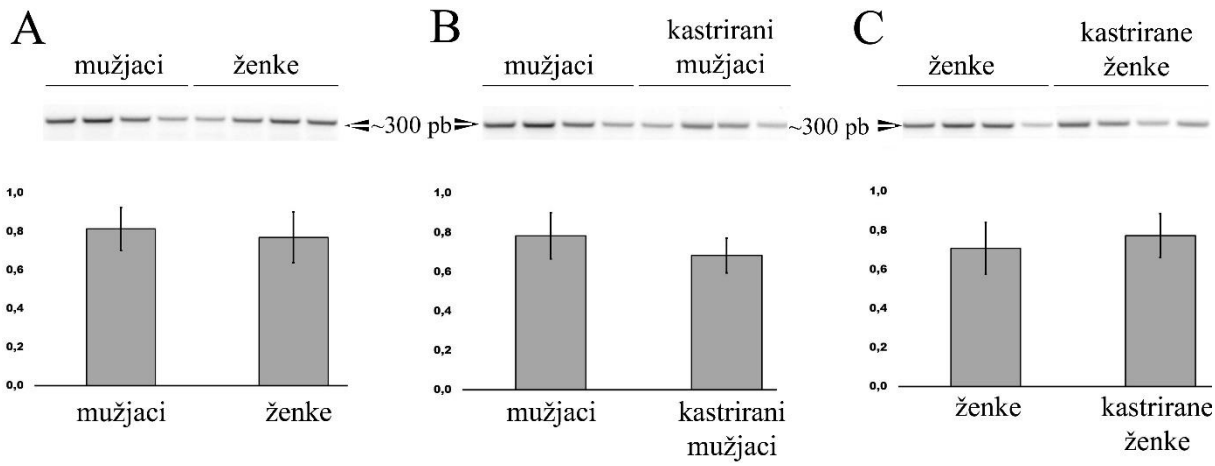
Slika 16. Spolne razlike u izraženosti proteina GLUT2 u ileumu svinje. Protutijelo protiv GLUT2 nije pokazalo razliku u obilježavanju bazolateralnih membrana enterocita mužjaka (A) i ženki (B), dok je kod kastriranih mužjaka (C) bila jača nego u mužjaka, a u ženki jača nego u kastriranih ženki (D). Proteinske pruge od ~60 kDa i ~35 kDa, dobivene *western*-analizom, bile su podjednako izražene u mužjaka i ženki (E), dok je izraženost kod kastriranih mužjaka (F) bila jača nego u mužjaka i ženki nego u kastriranih ženki (G). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.

5.2.4. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK

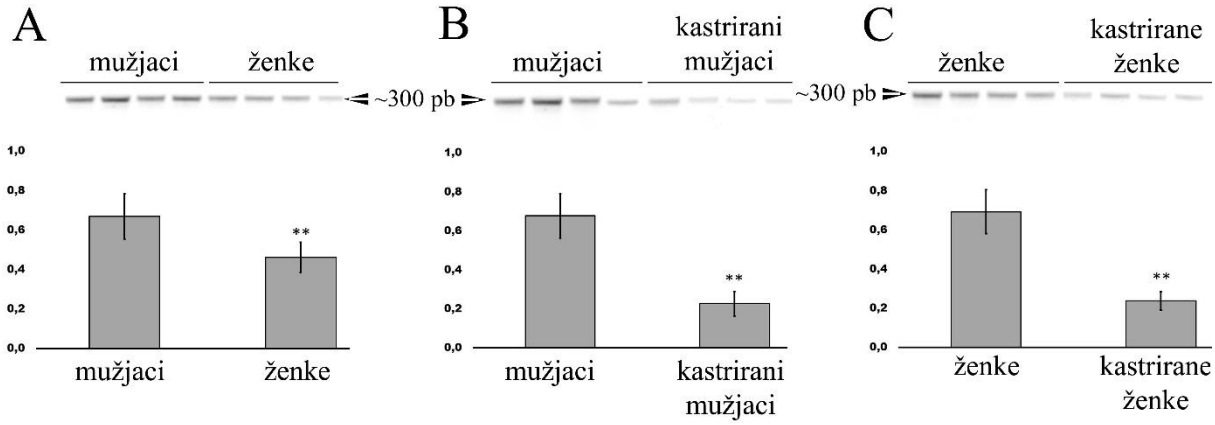
Iako su spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATPaze u korist ženki jasno izražene u duodenumu svinje, PCR analiza provedena na uzorcima cDNK dobivenih iz duodenuma nije pokazala sličan obrazac spolnih razlika (slike 17A – 17C). Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata na agaroznom gelu od ~300 pb, što odgovara veličini PCR produkta Na/K-ATPaze, nisu utvrđene spolne razlike.

Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK uočene su u jejunumu svinje. Pruge PCR produkata od ~300 pb bile su jače izražene u mužjaka nego u ženki (slika 18A) i kastriranih mužjaka (slika 18B). Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata utvrdilo se da je izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK u mužjaka jača otprilike 1,5 puta nego u ženki i otprilike 2,5 puta nego u kastriranih mužjaka. Izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK jača je u ženki nego u kastriranih ženki (slika 18C), i to za otprilike tri puta.

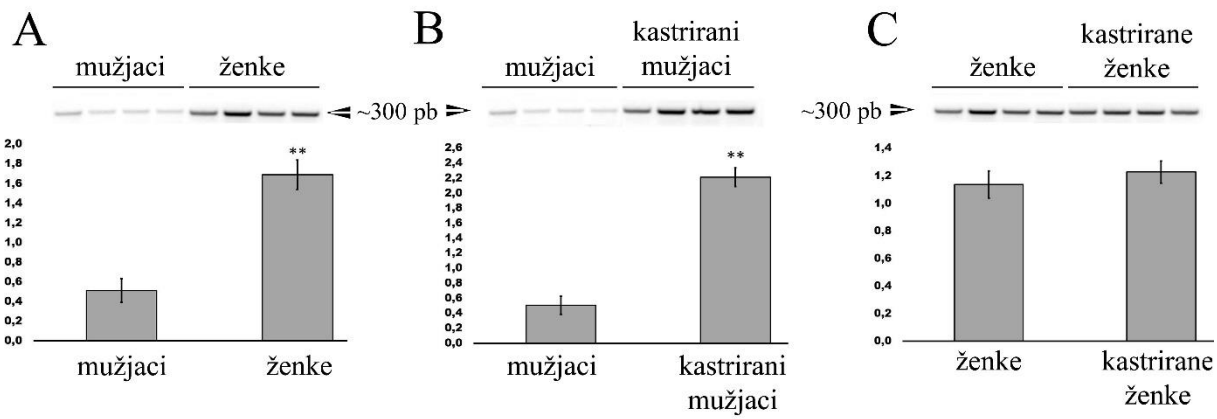
Izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK u ileumu svinje ne prati obrazac spolnih razlika kao u jejunumu, ali zato prati obrazac spolnih razlika u ileumu na proteinskoj razini koji nije bio statistički značajan. Pruge PCR produkta od ~300 pb bile su slabije izražene u mužjaka nego u ženki (slika 19A) za otprilike 3,5 puta te od kastriranih mužjaka (slika 19B) za otprilike 4,5 puta. Razlika u jačini pruga PCR produkata od ~300 pb između ženki i kastriranih ženki nije uočena (slika 19C), što je potvrđeno i denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata.



Slika 17. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u duodenumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~300 pb u agaroznom gelu ne pokazuje spolne razlike u duodenumu (A-C).



Slika 18. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u jejunumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~300 pb u agaroznom gelu pokazuje spolne razlike u duodenumu u korist mužjaka (A). Kastracija je kod mužjaka imala pozitivan utjecaj na izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK (B), dok je kod ženki imala negativan utjecaj (C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



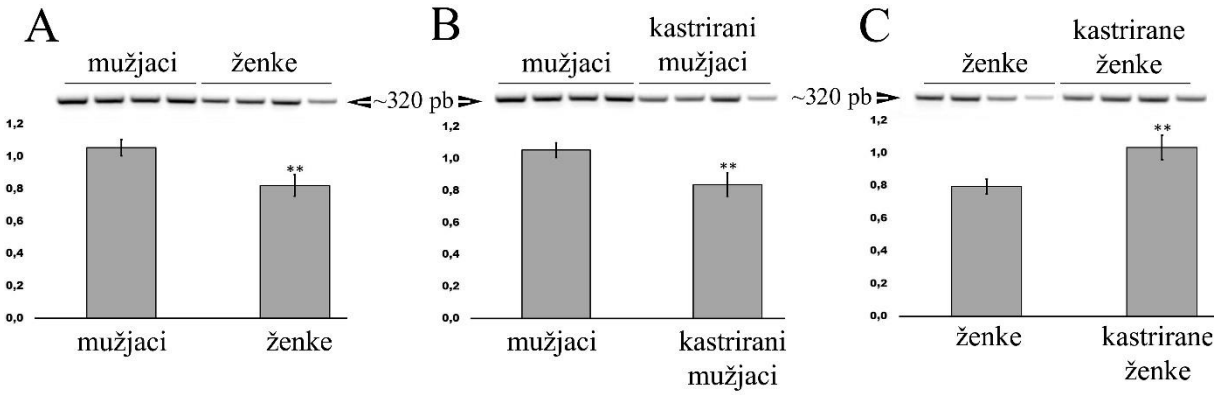
Slika 19. Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u ileumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~300 pb u agaroznom gelu pokazuje spolne razlike u ileumu u korist ženki (A). Kastracija je kod mužjaka imala pozitivan utjecaj na izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK (B), dok kod ženki nije imala utjecaj (C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.

5.2.5. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na razini mRNK

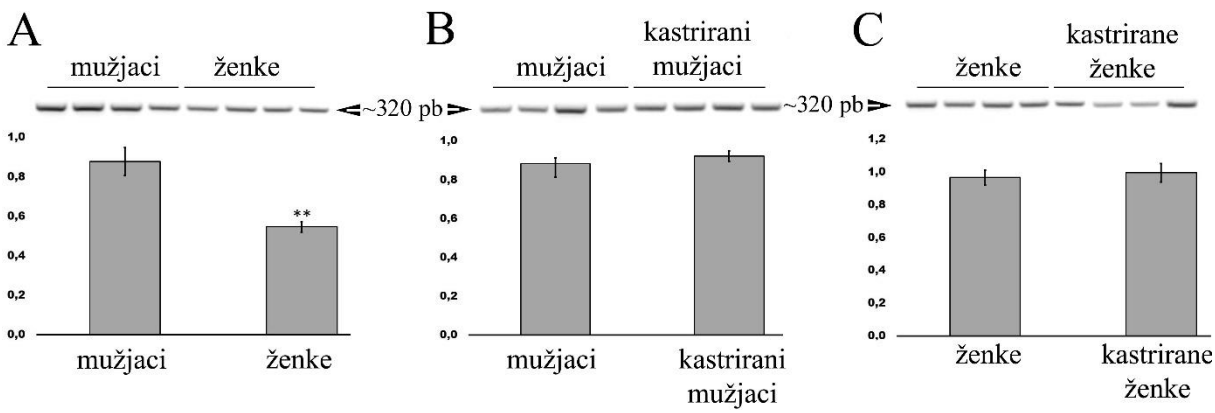
Uočene spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u duodenumu svinje nisu bile vidljive na razini proteina. Jačina pruga PCR produkata na agaroznom gelu od ~320 pb, što odgovara veličini PCR produkta SGLT1, mužjaka bila je podjednako jače izražena nego u ženki (slika 20A) i kastriranih mužjaka (slika 20B), i to za otprilike 1,3 puta. PCR pruge ženki bile su slabije izražene u agaroznom gelu nego PCR pruge kastriranih ženki (slika 20C) za otprilike 1,3 puta, što je i dokazano denzitometrijskim mjerenjem.

Spolne razlike u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u jejunumu uočena je između mužjaka i ženki (slika 21A). Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata od ~320 pb uočeno je da mužjaci imaju jaču izraženost od ženki otprilike 1,8 puta. Razlike u jačini pruga PCR produkata nisu uočene u jejunumu između mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 21B) i ženki i kastriranih ženki (slika 21C) što odgovara i nalazu u jejunumu na razini proteina SGLT1.

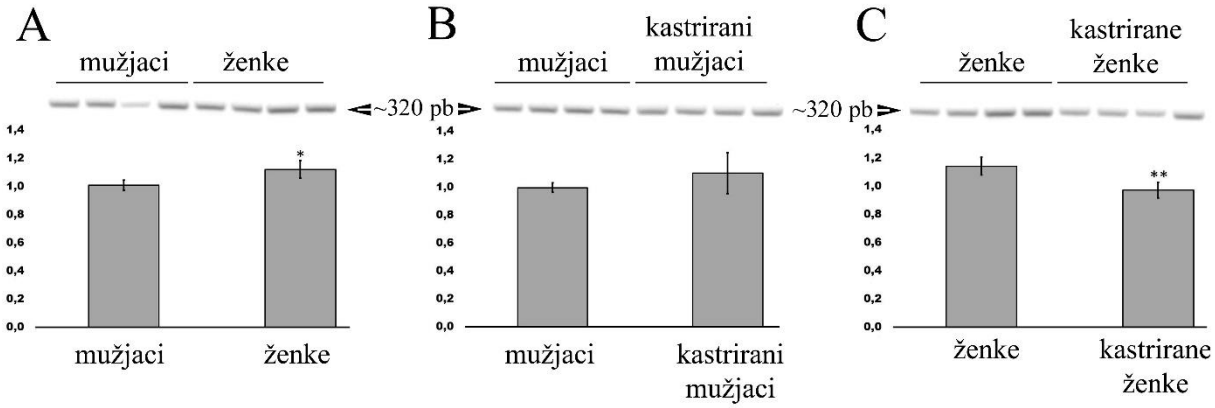
Suprotno nalazu na razini proteina, ali i prethodnim nalazima na razini mRNK u duodenumu i jejunumu, SGLT1 je na razini mRNK slabije izražen u mužjaka nego u ženki (slika 22A). Pregledom jačina pruga PCR produkata u agaroznom gelu od ~320 pb i denzitometrijskim mjerenjem nisu uočene razlike u izraženosti SGLT1 na razini mRNK između mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 22B) te između ženki i kastriranih ženki (slika 22C).



Slika 20. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na razini mRNK u duodenumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~320 pb u agaroznom gelu pokazuje spolne razlike u duodenumu u korist mužjaka (A). Kastracija je kod mužjaka imala negativan utjecaj na izraženost SGLT1 na razini mRNK (B), dok je kod ženki imala pozitivan utjecaj (C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



Slika 21. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na razini mRNK u jejunumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~320 pb u agaroznom gelu pokazuje spolne razlike u duodenumu u korist mužjaka (A). Kastracija nije imala utjecaja na izraženost SGLT1 na razini mRNK (B i C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.

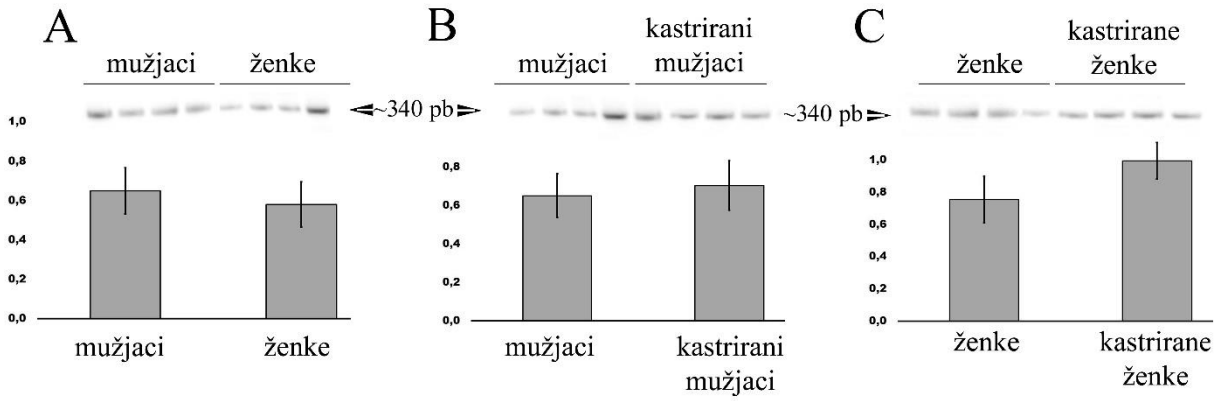


Slika 22. Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na razini mRNK u ileumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~300 pb u agaroznom gelu pokazuje spolne razlike u ileumu u korist ženki (A). Kastracija kod mužjaka nije imala utjecaj na izraženost SGLT1 na razini mRNK (B), dok je kod ženki imala negativan utjecaj (C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$. Zvjezdica (*) $p < 0,05$.

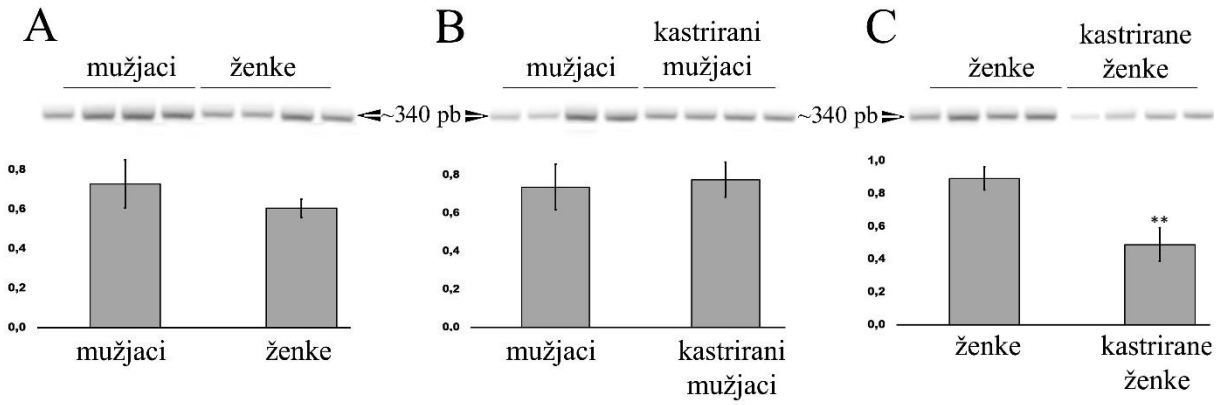
5.2.6. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na razini mRNK

Statistički značajne spolne razlike uočene u duodenumu i jejunumu na razini proteina GLUT2 u korist ženki, nisu uočene na razini mRNK. Izraženost pruga PCR produkata od ~340 pb, što odgovara veličini PCR produkta GLUT2, ne pokazuje razlike između skupina u duodenumu (slike 23A – 23C) i u jejunumu između mužjaka i ženki (slika 24A) te mužjaka i kastriranih mužjaka (slika 24B). Jačina pruga PCR produkata u jejunumu između ženki i kastriranih ženki pokazuje jasnu razliku (slika 24C), sličnu onoj uočenoj na razini proteina GLUT2. Denzitometrijskim mjerenjem utvrđeno je da jaču izraženost GLUT2 na razini mRNK imaju ženke za otprilike 1,8 puta nego kastrirane ženke.

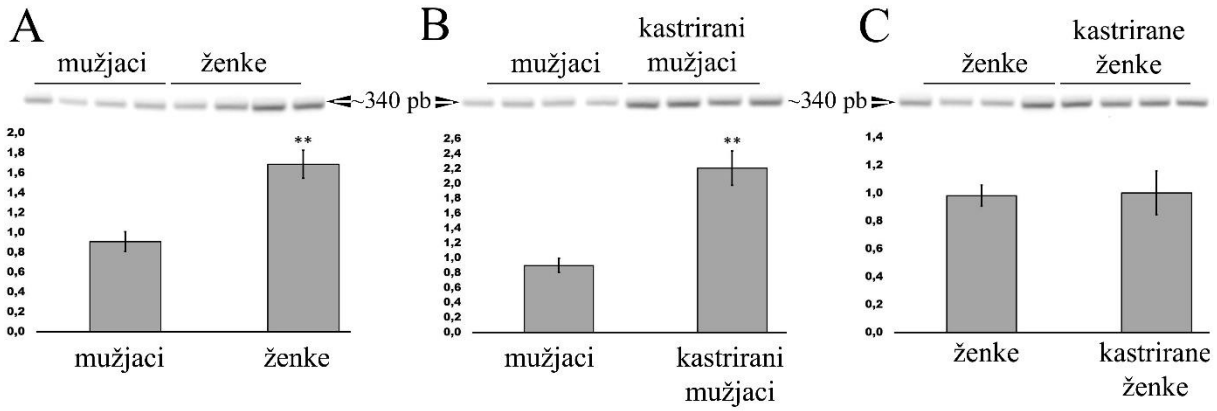
Dok u ileumu na razini proteina GLUT2 nisu uočene, spolne su razlike uočene u ileumu na razini mRNK. Mužjaci imaju slabije izraženu prugu PCR produkata od ~340 pb od ženki (slika 25A) otprilike dva puta i od kastriranih mužjaka (slika 25B) otprilike 2,5 puta. Pruge PCR produkata ne pokazuju razlike u jačini između ženki i kastriranih ženki (slika 25C).



Slika 23. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na razini mRNK u duodenumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~340 pb u agaroznom gelu ne pokazuje spolne razlike u duodenumu (A – C).



Slika 24. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na razini mRNK u jejunumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~340 pb u agaroznom gelu ne pokazuje spolne razlike u duodenumu (A). Kastracija kod mužjaka nije imala utjecaj na izraženost GLUT2 na razini mRNK (B), dok je kod ženki imala negativan utjecaj (C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.



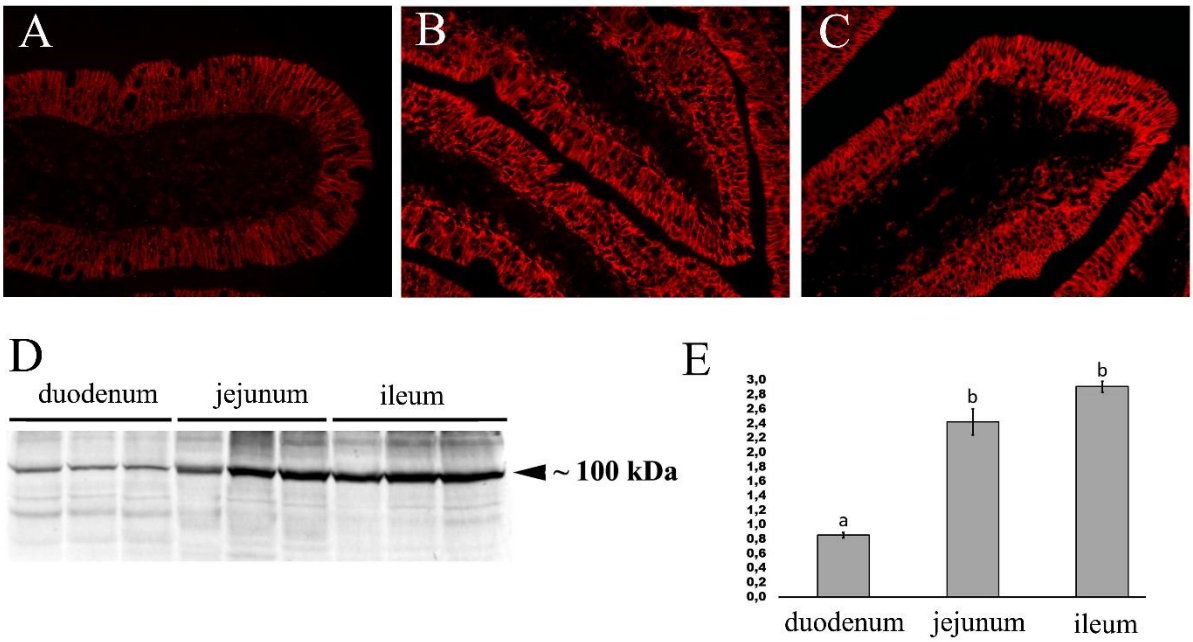
Slika 25. Spolne razlike u izraženosti GLUT2 na razini mRNK u ileumu svinje. Jačina pruga PCR produkata od ~340 pb u agaroznom gelu pokazuje spolne razlike u ileumu u korist ženki (A). Kastracija je kod mužjaka imala pozitivan utjecaj na izraženost GLUT2 na razini mRNK (B), dok kod ženki nije imala utjecaj (C). Dvije zvjezdice (**) $p < 0,01$.

5.3. Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 duž tankog crijeva svinje

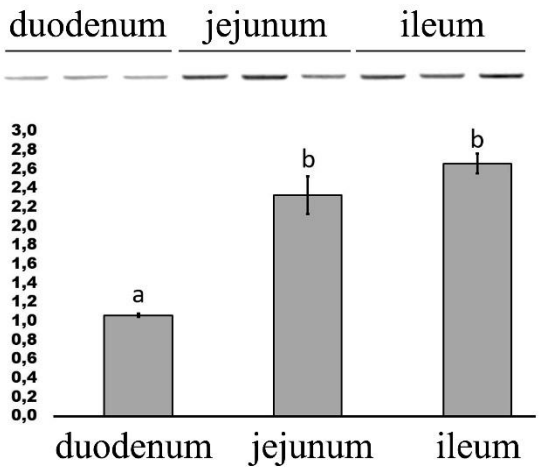
5.3.1. Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze

Na tkivnim narescima duodenuma (slika 26A), jejunuma (slika 26B) i ileuma (slika 26C) mužjaka uočljiva je razlika u intenzitetu fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita, koja je najslabija u duodenumu. *Western*-analizom USM-a enterocita mužjaka dobivene su proteinske pruge od ~100 kDa, što odgovara proteinu Na/K-ATPaze, koje pokazuju razliku u raspodjeli izraženosti duž tankog crijeva mužjaka (slika 26D). Uočeno je da je izraženost proteina Na/K-ATPaze najslabija u duodenumu, i to otprilike 2,5 puta nego u jejunumu i ileumu mužjaka (slika 26E). Jačine pruga PCR produkata od ~300 pb, koje odgovaraju PCR produktu Na/K-ATPaze, prate raspodjelu izraženosti duž tankog crijeva mužjaka utvrđenih na razini proteina Na/K-ATPaze. Najjača izraženost pruga PCR produkata uočena je u ileumu mužjaka (slika 27). Neznatno slabija izraženost uočena je u jejunumu, dok je vidljivo najslabija izraženost bila u duodenumu mužjaka. Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata od ~300 pb potvrđena je otprilike 2,5 put slabija izraženost Na/K-ATPaze u duodenumu nego u jejunumu i ileumu mužjaka.

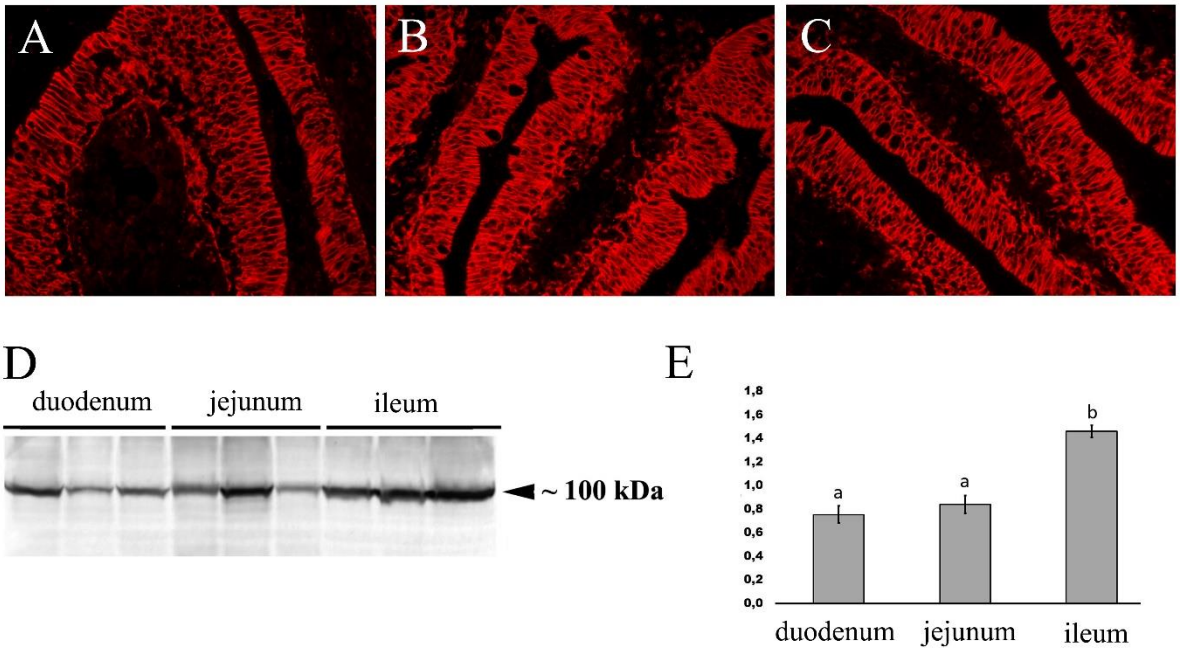
Slično tkivnim narescima mužjaka, u ženki je uočeno da bazolateralne membrane enterocita na tkivnim narescima duodenuma (slika 28A) i jejunuma (slika 28B) imaju slabiji intenzitet fluorescencije nego tkivni naresci ileuma (slika 28C). Jačina proteinskih pruga dobivenih *western*-analizom jasno potkrepljuje nalaz imunohistokemijske metode. Proteinske pruge od ~100 kDa slabije su izražene u duodenumu i jejunumu ženki nego u ileumu ženki (slika 28D). Denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga uočena je manja izraženost proteina Na/K-ATPaze u duodenumu i jejunumu ženki za otprilike 1,8 puta nego u ileumu ženki (slika 28E). Pruge PCR produkata od ~300 pb iz uzoraka ileuma ženki pokazuju vidljivo jaču izraženost nego pruge PCR produkata iz uzoraka duodenuma i jejunuma ženki (slika 29). Slično kao i kod mužjaka, raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK raste od najniže u duodenumu do otprilike 4,5 jače izraženosti u ileumu ženki.



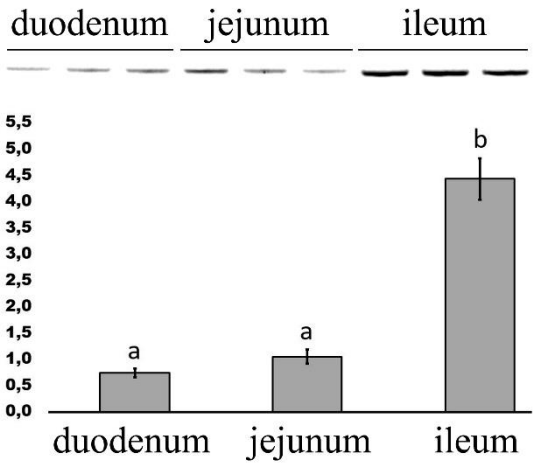
Slika 26. Raspodjela izraženosti proteina Na/K-ATPaze duž tankog crijeva u mužjaka. Jačina izraženosti proteina Na/K-ATPaze u mužjaka raste od duodenuma prema ileumu (A – C). Jačine proteinskih pruga, dobivenih *western*-analizom od ~100 kDa, prate uzorak raspodjele jačine fluorescencije uočene imunohistokemijom metodom (D i E). Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 27. Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK duž tankog crijeva u mužjaka. Jačina izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u mužjaka raste od duodenuma prema ileumu. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 28. Raspodjela izraženosti proteina Na/K-ATPaze duž tankog crijeva u ženki. Jačina izraženosti proteina Na/K-ATPaze u ženki raste od duodenuma prema ileumu (A-C). Jačine proteinskih pruga, dobivenih *western*-analizom od ~100 kDa, prate uzorak raspodjele jačine izraženosti uočene imunohistokemijom metodom (D i E). Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.

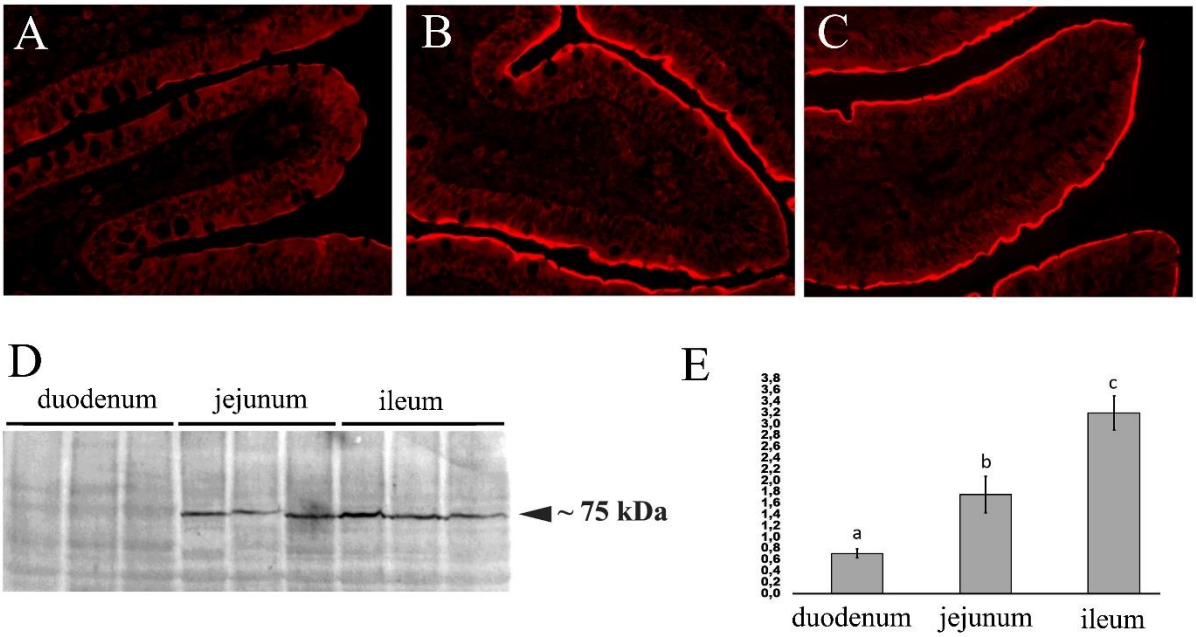


Slika 29. Raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK duž tankog crijeva u ženki. Jačina izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u mužjaka raste od duodenuma prema ileumu. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.

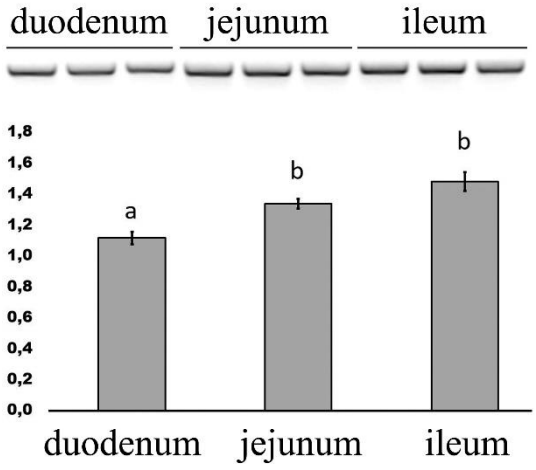
5.3.2. Raspodjela izraženosti SGLT1

U tkivnim narescima duodenuma (slika 30A), jejunuma (slika 30B) i ileuma (slika 30C) mužjaka vidljiva je razlika u intenzitetu fluorescencije četkastih membrana enterocita. Uočeno je da intenzitet fluorescencije raste od duodenuma, gdje je najniži, prema ileumu, gdje je najjači. *Western*-analizom iz USM-a enterocita duodenuma, jejunuma i ileuma mužjaka potvrđen je nalaz imunohistokemijske metode. Proteinske pruge od ~75 kDa, koje odgovaraju proteinu SGLT1, dobivene *western*-analizom, slabije su izražene u duodenumu nego u jejunumu i ileumu mužjaka (slika 30D). Denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga utvrđena je statistički značajna razlika u izraženosti SGLT1 između pojedinih dijelova tankog crijeva, s najnižom izraženošću u duodenumu, koja je niža otprilike 2,5 puta nego u jejunumu i otprilike 4,5 puta nego u ileumu (slika 30E). Raspodjela izraženosti SGLT1 na razini mRNK prati raspodjelu izraženosti na razini proteina SGLT1. Jačina pruga PCR produkata na agaroznom gelu od ~320 pb, što odgovara veličini PCR produkta SGLT1, slabija je u duodenumu nego u jejunumu i ileumu mužjaka (slika 31). Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkta potvrđena je razlika u raspodjeli SGLT1 u tankom crijevu. Najniža izraženost SGLT1 utvrđena je u duodenumu mužjaka koja je niža otprilike 1,5 puta nego u jejunumu i ileumu.

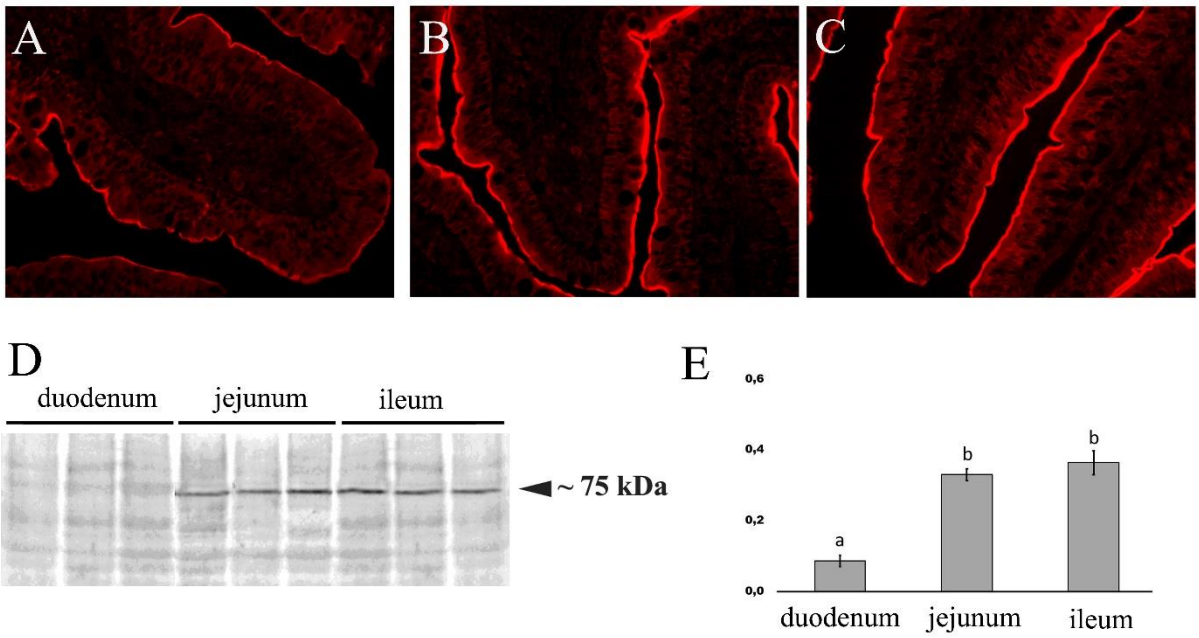
Raspodjela intenziteta fluorescencije četkastih membrana u tkivnim narescima duodenuma (slika 32A), jejunuma (slika 32B) i ileuma (slika 32C) ženki pokazuje sličan uzorak raspodjele intenziteta fluorescencije kao kod mužjaka, odnosno najniži intenzitet fluorescencije u duodenumu te viši u jejunumu i ileumu. Rezultati *western*-analize USM-a enterocita ženki potkrepljuju nalaz dobiven imunohistokemijskom metodom o raspodjeli izraženosti proteina SGLT1. Dobivene proteinske pruge od ~75 kDa jače su izražene u jejunumu i ileumu nego u duodenumu ženki (slika 32D). Denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga utvrđeno je da je izraženost SGLT1 u duodenumu slabija otprilike tri puta nego u jejunumu i ileumu ženki (slika 32E). Jačina pruga PCR produkata od ~320 pb u ženki prati uzorak raspodjele izraženosti SGLT1 duž tankog crijeva utvrđeno kod mužjaka: najniža izraženost u duodenumu koja raste prema najvišoj izraženošću u ileumu (slika 33). Denzitometrijskim mjerenjem PCR pruga potvrđena je statistički značajna razlika u izraženosti SGLT1 na razini mRNK između pojedinih dijelova tankog crijeva ženki. Izraženost SGLT1 na razini mRNK u duodenumu ženki otprilike je 1,5 puta niža nego u jejunumu i otprilike dva puta niža nego u ileumu.



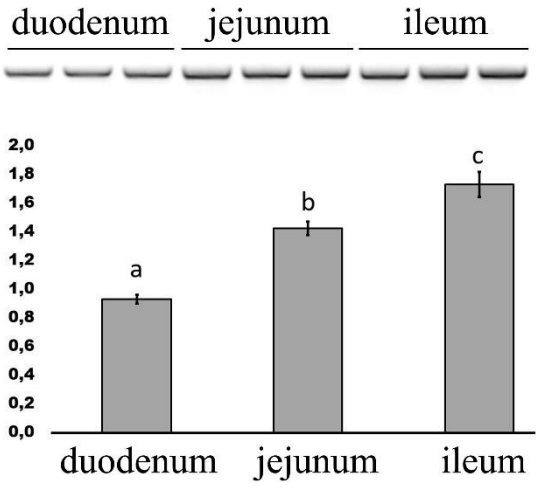
Slika 30. Raspodjela izraženosti proteina SGLT1 duž tankog crijeva u mužjaka. Jačina izraženosti proteina SGLT1 u mužjaka, slično kao i Na/K-ATPaza, raste od duodenuma prema ileumu (A – C). Jačine proteinskih pruga, dobivenih *western*-analizom od ~75 kDa, prate uzorak raspodjele jačine izraženosti uočene imunohistokemijom metodom (D i E). Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 31. Raspodjela izraženosti SGLT1 na razini mRNK duž tankog crijeva u mužjaka. Jačina izraženosti SGLT1 na razini mRNK u mužjaka raste od duodenuma prema ileumu. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 32. Raspodjela izraženosti proteina SGLT1 duž tankog crijeva u ženki. Jačina izraženosti proteina SGLT1 u ženki, slično kao i kod mužjaka, niža je u duodenumu (A) nego u jejunumu (B) i ileumu (C). Jačine proteinskih pruga, dobivenih *western*-analizom od ~75 kDa, prate raspodjelu jačine uočene imunohistokemijom metodom (D i E). Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.

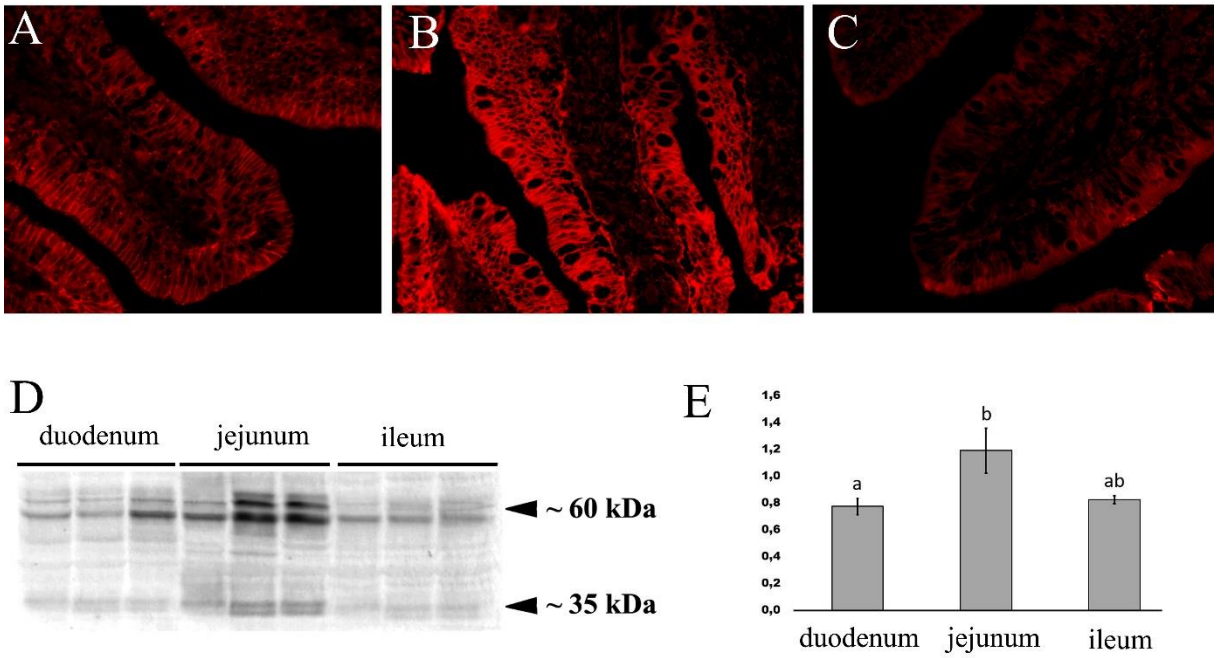


Slika 33. Raspodjela izraženosti SGLT1 na razini mRNK duž tankog crijeva u ženki. Jačina izraženosti SGLT1 na razini mRNK u ženki raste od duodenuma prema ileumu. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.

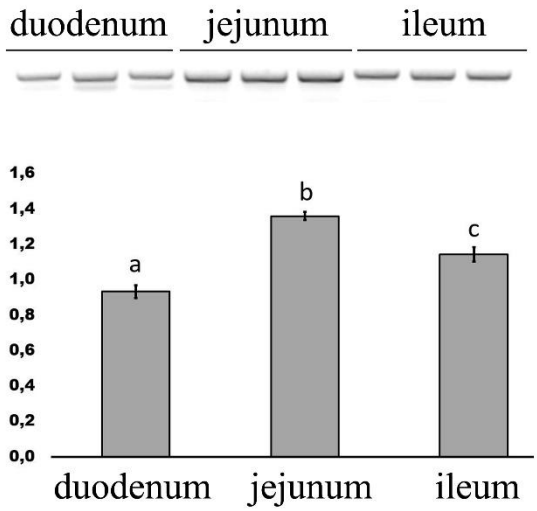
5.3.3. Raspodjela izraženosti GLUT2

U tkivnim narescima duodenuma (slika 34A), jejunuma (slika 34B) i ileuma (slika 34C) mužjaka vidljiva je razlika u raspodjeli intenziteta fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita. Bazolateralne membrane enterocita u jejunumu mužjaka pokazuju najjači intenzitet fluorescencije, dok razlike u intenzitetu fluorescencije između duodenuma i ileuma nisu uočene. Jačina proteinskih pruga od ~60 kDa i ~35 kDa, koje odgovaraju proteinu GLUT2, dobivene *western*-analizom USM-a enterocita duodenuma, jejunuma i ileuma mužjaka, prate raspodjelu izraženosti utvrđene imunohistokemijskom metodom. Proteinske pruge najjače su izražene u jejunumu mužjaka (slika 34D), i to otprilike 1,5 puta jače nego u duodenumu, dok značajna razlika u izraženosti GLUT2 na proteinskoj razini između jejunuma i ileuma nije uočena (slika 34E). Raspodjela izraženosti GLUT2 na razini mRNK prati raspodjelu izraženosti na razini proteina GLUT2. Pruge PCR produkata na agaroznom gelu od ~340 pb, što odgovara veličini PCR produkta GLUT2, najjače su bile izražene u jejunumu mužjaka, a najslabije u duodenumu mužjaka (slika 35). Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata utvrđeno je da izraženost GLUT2 na razini mRNK prati raspodjelu GLUT2 na proteinskoj razini duž tankog crijeva mužjaka s najvećom izraženošću, otprilike 1,5 puta, u jejunumu.

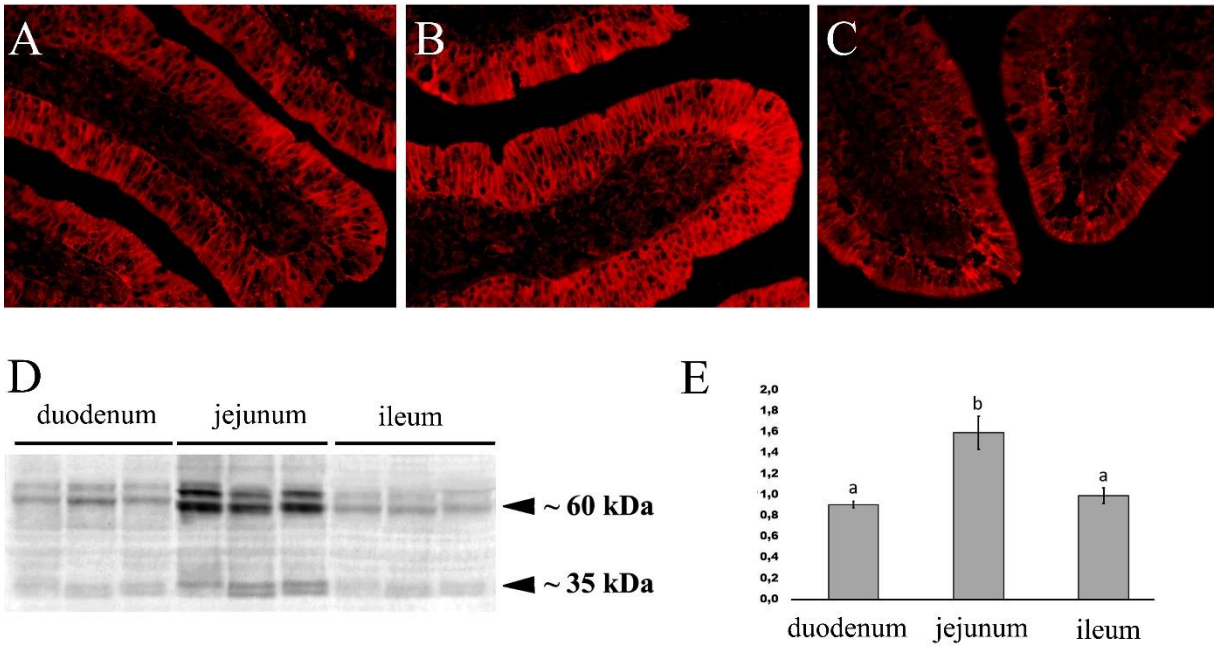
Slično nalazu u mužjaka, intenzitet fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita u tkivnim narescima duodenuma (slika 36A), jejunuma (slika 36B) i ileuma (slika 36C) pokazuje razlike u raspodjeli intenziteta. Tkivni naresci jejunuma ženki pokazuju najintenzivniju fluorescenciju bazolateralnih membrana, dok razlike u intenzitetu fluorescencije duodenuma i ileuma ženki nisu uočene. Proteinske pruge od ~60 kDa i ~35 kDa uočljivo su najjače izražene u jejunumu (slika 36D). Denzitometrijskim mjerenjem proteinskih pruga utvrđena je otprilike 1,8 puta viša izraženost GLUT2 na proteinskoj razini u jejunumu ženki nego u duodenumu i ileumu (slika 36E). Raspodjela izraženosti GLUT2 na razini mRNK duž tankog crijeva ženki ne prati raspodjelu na razini proteina GLUT2. Pruge PCR produkata od ~340 pb podjednako su bile jako izražene u jejunumu i ileumu ženki, dok su pruge PCR produkata u duodenumu bile najslabije izražene (slika 37). Denzitometrijskim mjerenjem pruga PCR produkata utvrđena je značajno niža izraženost GLUT2 u duodenumu nego u jejunumu i ileumu ženki, za otprilike 2,5 puta.



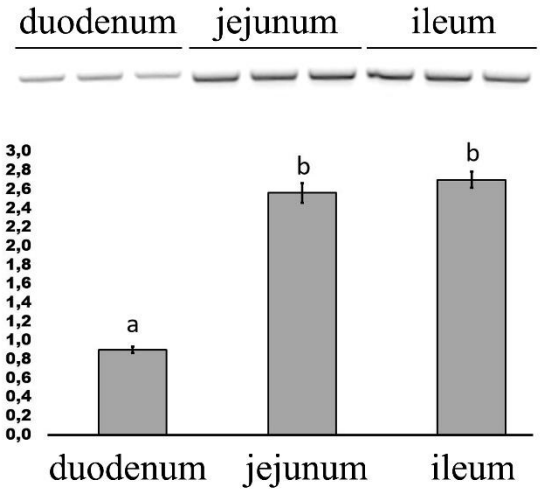
Slika 34. Raspodjela izraženosti proteina GLUT2 duž tankog crijeva u mužjaka. Jačina izraženosti proteina GLUT2 otprilike je podjednaka u duodenumu (A) i ileumu (C), dok je najjača u jejunumu (B). Proteinske pruge, dobivene *western*-analizom od ~60 kDa i ~35 kDa, najjače su izražene u jejunumu (D i E). Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 35. Raspodjela izraženosti GLUT2 na razini mRNK duž tankog crijeva u mužjaka. Jačina izraženosti GLUT2 na razini mRNK najjača je u jejunumu, a najslabija u duodenumu mužjaka. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 36. Raspodjela izraženosti proteina GLUT2 duž tankog crijeva u ženki. Jačina izraženosti proteina GLUT2 podjednaka je u duodenumu (A) i ileumu (C), dok je najjača u jejunumu (B). Proteinske pruge, dobivene *western*-analizom od ~60 kDa i ~35 kDa, najjače su izražene u jejunumu (D i E). Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.



Slika 37. Raspodjela izraženosti GLUT2 na razini mRNK duž tankog crijeva u ženki. Jačina izraženosti GLUT2 na razini mRNK podjednako je jaka u jejunumu i ileumu, a najslabija je u duodenumu ženki. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju, $p < 0,05$.

6. RASPRAVA

Tanko crijevo, kao organ u kojemu se u najvećoj mjeri apsorbiraju hranjive tvari tijekom probave, primarno je mjesto izraženosti mnogih prijenosnika za apsorpciju hranjivih tvari. Iako se izraženost SGLT1 i GLUT2 može naći i u drugim tkivima, među najjačim izraženostima u tijelu ima upravo tanko crijevo (CHEN i sur., 2010). Na/K-ATPaza, kao prijenosnik natrijevih i kalijevih iona, u uskoj je funkcionalnoj vezi s prijenosnikom glukoze ovisnog o natriju SGLT1, kojemu stvara elektrokemijski gradijent natrijevih iona, koji je pak pokretačka sila za prijenos glukoze putem SGLT1 (SRICHAMROEN, 2013). Kako se u dosadašnjim istraživanjima nije uspjelo dokazati postojanje spolnih razlika u izraženosti Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2 u tankim crijevima pokusnih životinja, pa tako i svinje, u ovom je istraživanju opisan stanični smještaj, te po prvi put izraženost spolnih razlika na razini proteina i mRNK i raspodjela izraženosti u pojedinim dijelovima tankog crijeva, duodenumu, jejunumu i ileumu, za prijenosnike uključene u prijenos glukoze kroz membrane enterocita svinje: Na/K-ATPaza, SGLT1 i GLUT2.

6.1. Utjecaj spola na izraženost Na/K-ATPaze u tankom crijevu svinje

Ovim je istraživanjem potvrđen smještaj Na/K-ATPaze u duodenumu, jejunumu i ileumu svinje, slično kao i u drugim stanicama u tijelu (ERNST i HOOTMAN, 1981), isključivo na bazolateralnoj membrani enterocita, s time da su i stanice unutar kripti pokazale bazolateralno obojenje. Izraženost Na/K-ATPaze na proteinskoj razini, i imunohistokemijskom metodom i *western*-analizom, pokazuje spolne razlike u korist ženki u tankom crijevu svinje. Iako je izraženost na razini proteina Na/K-ATPaze bila viša u ženki u svim dijelovima tankog crijeva, jedino je u duodenumu bila značajna. Inhibitorni utjecaj testosterona, koji ima za posljedicu jaču izraženost Na/K-ATPaze na razini proteina u ženki, nađen je u srcu štakora i pasa (DŽURBA i sur., 1997) i bubregu štakora (QUINTAS i sur., 1997). DŽURBA i sur. (1997) dokazuju u svom istraživanju na psima da ženski spolni hormoni imaju pozitivan utjecaj na izraženost Na/K-ATPaze na razini proteina u sarkolemi srca. U ovom je istraživanju najveća razlika u izraženosti Na/K-ATPaze između skupina uočena u duodenumu. Mužjaci su nakon kastracije imali značajno višu izraženost Na/K-ATPaze na proteinskoj razini u duodenumu i jejunumu u usporedbi s nekastriranim mužjacima, dok je izraženost u ileumu također bila viša u kastriranih mužjaka, ali ne značajno. Porast izraženosti proteina Na/K-ATPaze nakon kastracije mužjaka upućuje na inhibitorni utjecaj testosterona na izraženost Na/K-ATPaze.

Značajno niža izraženost u duodenumu i ileumu nakon kastracije ženki upućuje na pozitivan utjecaj ženskih spolnih hormona na izraženost Na/K-ATPaze na proteinskoj razini. Pozitivan utjecaj ženskih spolnih hormona dokazan je i u samoj aktivnosti prijenosa natrijevih iona, koji se ponajprije odvija putem natrij-kalijeve crpke, a koja bi mogla biti posljedica povećane izraženosti Na/K-ATPaze na staničnim membranama u plućima štakora (KALTOFEN i sur., 2015). Iako su ovim istraživanjem uočene spolne razlike u izraženosti proteina Na/K-ATPaze, one nisu uočene na razini mRNK u duodenumu svinja, dok spolne razlike u jejunumu i ileumu ne prate raspodjelu izraženosti na proteinskoj razini što upućuje na postojanje regulatornih mehanizama izraženosti gena za Na/K-ATPazu od strane spolnih hormona na posttranskripcijskoj razini. Utjecaj spola na izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK je kontradiktoran, dok spolnih razlika u izraženosti u duodenumu nema, jejunum i ileum pokazuju značajne, iako suprotne, spolne razlike u izraženosti. Spolna razlika u izraženosti Na/K-ATPaze na razini mRNK u jejunumu u korist mužjaka te smanjenje izraženosti nakon kastracije upućuje na pozitivan utjecaj testosterona na izraženost Na/K-ATPaze, dok u ileumu testosteron ima izrazito inhibitorni utjecaj. Zbog suprotnih utjecaja spolnih hormona na izraženost Na/K-ATPaze na razini mRNK u jejunumu i ileumu svinje, teško je zaključiti djeluju li spolni hormoni izravno ili posredno djelujući na razinu nekih drugih hormona ili čimbenika.

6.2. Utjecaj spola na izraženost SGLT1 u tankom crijevu svinje

Stanični smještaj SGLT1 isključivo na četkastim membranama enterocita u svim dijelovima tankog crijeva, što se u potpunosti slaže s njegovom ulogom primarnog prijenosnika glukoze iz lumena tankog crijeva u enterocit, dobro je opisan u istraživanju YOSHIDA i sur. (1995) u štakora. Ovim je istraživanjem imunohistokemijskom metodom potvrđen identičan smještaj SGLT1 isključivo na četkastim membranama enterocita u duodenumu, jejunumu i ileumu svinja, uz izostanak izraženosti u stanicama unutar kripti i na vršnim membranama vrčastih stanica. Slabija izraženost SGLT1 na samom vrhu crijevne resice, uočena u ovom istraživanju na tkivnim narescima tankog crijeva svinje, primijećena je i u štakora te se smatra da je posljedica smanjene izraženosti mRNK na vršnom dijelu crijevne resice uslijed skore apoptoze i ljuštenja enterocita u lumen tankog crijeva (YOSHIKAWA i sur., 2011). Unatoč slabijoj izraženosti proteina SGLT1 i stoga slabijem intenzitetu fluorescencije četkastih membrana enterocita na samom vrhu crijevne resice svinja, izraženost Na/K-ATPaze, pa tako

i intenzitet fluorescencije bazolateralnih membrana enterocita na vrhu crijevne resice, ostaje nepromijenjena, što je uočeno i kod kunića (ROWLING i SEPULVEDA, 1984). Iako su se u istraživanjima na bubrezima (SABOLIĆ i sur., 2006; NAGAI i sur., 2014) i mozgu (HART i sur., 1998) laboratorijskih glodavaca uspjele dokazati spolne razlike u izraženosti proteina SGLT1 u korist ženki, koje upućuju na inhibitorni utjecaj testosterona, izraženost proteina SGLT1 u tankom crijevu svinje u ovom istraživanju većinom nije pokazivala spolne razlike. Unatoč uočenoj značajnoj razlici među spolovima u izraženosti SGLT1 na proteinskoj razini u ileumu, ona nije dokazana u svinja nakon kastracije te se ne može zaključiti da spol, odnosno određeni spolni hormoni imaju pozitivan ili inhibitorni utjecaj na izraženost. Ovakav nalaz izostanka spolnih razlika u tankim crijevima svinje podudara se s rezultatima istraživanja izraženosti proteina SGLT1 u tankim crijevima štakora u kojih također nisu dokazane spolne razlike u duodenumu, jejunumu i ileumu (BALEN i sur., 2008). Izraženost SGLT1 na razini mRNK u ovom istraživanju pokazuje spolne razlike u korist mužjaka u duodenumu i jejunumu svinja što upućuje na pozitivan utjecaj testosterona, odnosno inhibitorni utjecaj estrogena, na izraženost SGLT1 na razini mRNK u duodenumu i jejunumu svinje. No, zbog izostanka spolnih razlika na razini proteina, pretpostavlja se da na izraženost SGLT1 na razini proteina djeluju posttranskripcijski, a možda čak i posttranslacijski regulatorni mehanizmi, koji su uočeni u regulaciji izraženosti gena za SGLT1 u tankom crijevu kokoši (BARFULL i sur., 2002) i ovaca (LESCALE-MATYS i sur., 1993). Suprotno nalazu u duodenumu i jejunumu, u ileumu svinja uočen je pozitivan utjecaj estrogena na izraženost SGLT1 na razini mRNK. No, izostanak spolne razlike u korist ženki na razini proteina SGLT1 dodatno potkrepljuje činjenicu da na izraženost SGLT1 proteina djeluju posttranskripcijski ili čak posttranslacijski regulatorni mehanizmi. Zbog uočenih razlika u izraženosti SGLT1 na razini mRNK te nedosljednih rezultata ovog dijela istraživanja, nije moguće zaključiti inhibiraju li spolni hormoni sintezu proteina SGLT1 ili je potiču, te djeluju li izravno ili posredno preko drugih nepoznatih regulatornih mehanizama.

6.3. Utjecaj spola na izraženost GLUT2 u tankom crijevu svinje

Prijenosnik GLUT2 smješten je isključivo na bazolateralnim membranama enterocita u svim dijelovima tankog crijeva, gdje sudjeluje u prijenosu glukoze iz enterocita van u međustanični prostor (WRIGHT i TURK, 2004). Iako se u štakora uspio dokazati smještaj

GLUT2 na četkastim membranama enterocita u tankom crijevu (AFFLECK, i sur.,2003), pogotovo u uvjetima povišene koncentracije glukoze u lumenu crijeva, rezultati ovog istraživanja to nisu uspjeli dokazati. No, treba uzeti u obzir činjenicu da su svinje iz ovog istraživanja bile dopremljene do klaonice te im određeno vrijeme tijekom utovara, prijevoza i kratkog odmora prije klanja nije bila dostupna hrana, što je zasigurno smanjilo koncentraciju glukoze unutar lumena crijeva. Imunohistokemijskom metodom na tkivnim narescima duodenuma, jejunuma i ileuma potvrđen je stanični smještaj GLUT2 na bazolateralnim membranama enterocita svinja. Izraženost proteina GLUT2 u duodenumu i jejunumu svinje pokazuje uočljive spolne razlike u korist ženki, što upućuje na pozitivan utjecaj estrogena na izraženost GLUT2 na razini proteina. Iako u ileumu razlike nisu bile statistički značajne, izraženost proteina svejedno je bila jača u ženki. Kastracijom mužjaka pojačava se izraženost proteina GLUT2 u duodenumu i jejunumu svinja čime je utvrđen inhibitorni utjecaj testosterona, dok se kastracijom ženki smanjila izraženost što dodatno potvrđuje pozitivan utjecaj estrogena na izraženost proteina GLUT2 u tankim crijevima svinje. CUI i sur. (2003) u istraživanjima na štakorskom jejunumu dokazuju pozitivnu korelaciju između količine glukoze i fruktoze unutar lumena crijeva i izraženosti GLUT2 na razini mRNK te da se regulatorni mehanizmi povećanja izraženosti GLUT2 na mRNK razini događaju tijekom transkripcije, što upućuje na činjenicu da povećanje izraženosti na mRNK razini dovodi i do povećanja na razini proteina. Ovakvu usku vezu između izraženosti na razini proteina i mRNK u ovom istraživanju na tankom crijevu svinje nije uočena. Štoviše, spolne razlike u izraženosti GLUT2 na razini mRNK nisu uočene u duodenumu i jejunumu gdje su bile izrazite spolne razlike u izraženosti proteina GLUT2. U ileumu svinje je pak uočen inhibitorni utjecaj testosterona na izraženost GLUT2 na razini mRNK, gdje su mužjaci imali nižu izraženosti od ženki i kastriranih mužjaka. Inhibitorni utjecaj testosterona i posljedično tome jača izraženost GLUT2 na razini mRNK u bubrezima i mozgu ženki dokazana je u miševa (NAGAI i sur., 2014).

6.4. Raspodjela prijenosnika glukoze duž tankog crijeva svinje

WILD i sur. (1999) u svom istraživanju izraženosti Na/K-ATPaze u jejunumu i ileumu štakora utvrđuju značajno višu izraženost α1 i β1-podjedinice Na/K-ATPaze u jejunumu nego ileumu, dok je izraženost α1 i β1-podjedinice Na/K-ATPaze na razini mRNK viša, iako ne značajno, u ileumu. Ovakva razlika u izraženosti na razini proteina i mRNK upućuje na

postojanje posttranskripcijskih mehanizama u regulaciji gena za Na/K-ATPazu. U ovom istraživanju izraženost proteina Na/K-ATPaze raste od duodenuma prema ileumu u mužjaka i ženki. Slična raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze unutar tankog crijeva uočena je i na razini mRNK u mužjaka i ženki. Ovakva veza u izraženosti na razini proteina i mRNK upućuje na činjenicu da u svinje postoje regulatorni mehanizmi izraženosti gena za Na/K-ATPazu na razini transkripcije. S obzirom na to da metabolički aktivnije stanice imaju veću izraženost Na/K-ATPaze, koja je od esencijalne važnosti za život stanice, ovakva raspodjela izraženosti Na/K-ATPaze mogla bi upućivati na veću aktivnost prijenosničkih mehanizama u enterocitima ileuma nego u enterocitima duodenuma (KÖKSOY, 2002).

HERRMANN i sur. (2012) su u svom istraživanju na svinjama utvrdili da je izraženost proteina SGLT1 duž tankog crijeva najviša u jejunumu te da je izraženost otprilike podjednako niža u duodenumu i ileumu. Identična raspodjela izraženosti SGLT1 u tankom crijevu svinja uočena je i na razini mRNK (VAN DER WIELEN i sur., 2014). Raspodjela izraženosti SGLT1 na razini proteina i mRNK po duodenumu, jejunumu i ileumu svinja uočena ovim istraživanjem ne prati dosadašnje spoznaje. Važna i nezanemariva razlika između ovog istraživanja i istraživanja HERRMANN i sur. (2012) i VAN DER WIELEN i sur. (2014) jest starost svinja na kojima je rađeno istraživanje. Dok su svinje u istraživanjima od HERRMANN i sur. (2012) i VAN DER WIELEN i sur. (2014) prilikom žrtvovanja bile starosti 8 – 10 tjedana, svinje u ovom istraživanju su uoči klanja imale otprilike 10 mjeseci te su imale u potpunosti izdiferencirane enterocite naviknute na krutu hranu. Uočeno je da odmicanjem od razdoblja odbića sposobnost apsorpcije glukoze u ileumu raste u svinja te postaje veća nego u jejunumu (MONTAGNE i sur., 2007). U ovom je istraživanju kod mužjaka svinje uočena najviša izraženost SGLT1 na razini proteina i mRNK u ileumu i najniža u duodenumu te upućuje na to da se vjerojatno najveći dio apsorpcije glukoze iz lumena crijeva događa u središnjem i distalnom dijelu tankog crijeva. Raspodjela izraženosti SGLT1 u tankom crijevu ženki slična je uzorku raspodjele izraženosti uočene kod mužjaka, s time da je izraženost na razini proteina SGLT1 podjenako jača u jejunumu i ilemu nego u duodenumu. Funkcionalna ovisnost SGLT1 o Na/K-ATPazi vidljiva je i iz raspodjele izraženosti obaju proteina duž tankog crijeva, s najnižom izraženosti u duodenumu, koja raste prema najvišoj u ileumu.

Tanko je crijevo po izraženosti GLUT2 na razini mRNK u svinja drugi najzastupljeniji organ, odmah nakon jetara. ZUO i sur. (2010) u svom istraživanju na svinjama dokazuju da unatoč tome što je izraženost GLUT2 na razini mRNK najviša u jejunumu, a najniža u ileumu,

značajnih razlika između pojedinih dijelova tankog crijeva svinje nema. U ovom se istraživanju došlo do sličnih rezultata. Najviša je izraženost na razini proteina GLUT2 uočena u jejunumu kod mužjaka i ženki svinja s podjednako slabijom izraženosti u duodenumu i ileumu. Sličan uzorak raspodjele izraženosti GLUT2 na razini mRNK upućuje na usku povezanost izraženosti mRNK i proteina te na postojanje regulatornih mehanizama izraženosti gena za GLUT2 na razini transkripcije, što je dokazao CUI i sur. (2003) u svom istraživanju na tankom crijevu štakora. Ovakva raspodjela izraženosti GLUT2 pokazuje da se apsorpcija monosaharida u najvećoj mjeri odvija u središnjem dijelu tankoga crijeva svinje, što se jednim dijelom podudara s nalazima izraženosti Na/K-ATPaze i SGLT1.

7. ZAKLJUČCI

1. **Na/K-ATPaza izražena je na bazolateralnim membranama enterocita, vrčastih stanica i stanica unutar kripti u tankom crijevu svinje**

   Imunohistokemijskom metodom sa specifičnim protutijelom protiv Na/K-ATPaze utvrđen je očekivani stanični smještaj u enterocitima. Bazolateralne membrane enterocita, vrčastih stanica i stanica unutar kripti bile su obilježene fluorescentnom bojom, dok lamina proprija crijevnih resica nije pokazivala bojenje.

2. **SGLT1 izražen je na četkastim membranama enterocita u tankom crijevu svinje**

   Imunohistokemijskom metodom sa specifičnim protutijelom protiv SGLT1 utvrđen je očekivani stanični smještaj na četkastim membranama enterocita. Vršne membrane vrčastih stanica, stanice unutar kripti te lamina proprija crijevnih resica nisu pokazivale specifično fluorescentno bojenje. Jačina fluorescencije, koja označava izraženost proteina SGLT1, na vrhovima je slabija nego na bočnim dijelovima crijevnih resica.

3. **GLUT2 izražen je na bazolateralnim membranama enterocita u tankom crijevu svinje**

   Imunohistokemijskom metodom sa specifičnim protutijelom protiv GLUT2 utvrđen je očekivani stanični smještaj na bazolateralnim membranama enterocita. Stanice unutar kripti i lamina proprija crijevnih resica nisu pokazivale specifično fluorescentno bojenje.

4. **Na/K-ATPaza iz tankog crijeva svinje daje proteinsku prugu veličine ~100 kDa**

   Western-analizom sa specifičnim protutijelom protiv Na/K-ATPaze utvrđena je proteinska pruga veličine ~100 kDa.

5. **SGLT1 iz tankog crijeva svinje daje proteinsku prugu veličine ~75 kDa**

   Western-analizom sa specifičnim protutijelom protiv SGLT1 utvrđena je, iako vrlo slaba, proteinska pruga veličine ~75 kDa.

6. **GLUT2 iz tankog crijeva svinje daje proteinske pruge veličine ~60 kDa i ~35 kDa**

Western-analizom sa specifičnim protutijelom protiv GLUT2 utvrđene su dvije proteinske pruge veličine ~60 kDa i ~35 kDa. Obje su proteinske pruge specifične za GLUT2 te prilikom inkubacije u samo sekundarnom protutijelu obje proteinske pruge nisu bile izražene. Proteinska pruga od ~60 kDa je očekivana za GLUT2, dok dodatna proteinska pruga od ~35 kDa vjerojatno predstavlja deglikozilirani GLUT2.

7. **Izraženost Na/K-ATPaze pokazuje spolne razlike u korist ženki u tankom crijevu svinje**

Na/K-ATPaza je na proteinskoj razini jače izražena u duodenumu ženki. Kastrirani su mužjaci imali jaču izraženost proteina Na/K-ATPaze nego nekastrirani mužjaci što upućuje na inhibitorni utjecaj testosterona na izraženost proteina Na/K-ATPaze u tankom crijevu svinje. Na razini mRNK navedene spolne razlike nisu prisutne, što upućuje na postojanje regulatornih mehanizama izraženosti Na/K-ATPaze na posttranskripcijskoj razini.

8. **Izraženost SGLT1 ne pokazuje spolne razlike u tankom crijevu svinje**

Spolne razlike u izraženosti SGLT1 na proteinskoj razini nisu uočene u duodenumu i jejunumu, dok u ileumu svinje jesu u korist ženki. Kastracija mužjaka i ženki svinja nije utjecala na izraženost proteina SGLT1. Na razini mRNK postoje spolne razlike u izraženosti u duodenumu i jejunumu svinja u korist mužjaka. Različite izraženosti na razini proteina i mRNK upućuju na postojanje regulatornih mehanizama izraženosti SGLT1 na posttranskripcijskoj razini.

9. **Izraženost GLUT2 pokazuje spolne razlike u korist ženki u tankom crijevu svinje**

GLUT2 je na proteinskoj razini značajno jače izražen u duodenumu i jejunumu ženki. Nekastrirani su mužjaci imali značajno nižu izraženost GLUT2 u duodenumu i jejunumu nego kastrirani mužjaci što upućuje na inhibitorni utjecaj testosterona na izraženost proteina GLUT2. Suprotno tomu, kastracija ženki utjecala je na smanjenje izraženosti GLUT2 što upućuje na pozitivan utjecaj ženskih spolnih hormona. Na razini mRNK navedene spolne razlike prisutne su samo u ileumu. Različite izraženosti na razini proteina i mRNK upućuju na postojanje regulatornih mehanizama izraženosti GLUT2 na posttranskripcijskoj razini.

10. Izraženost Na/K-ATPaze u tankom crijevu svinje raste od duodenuma prema ileumu

Izraženost Na/K-ATPaze na razini proteina i mRNK najniža je u duodenumu, a najviša u ileumu. Razlike u obrascu raspodjele Na/K-ATPaze duž tankog crijeva između spolova nisu uočene.

11. Izraženost SGLT1 u tankom crijevu svinje raste od duodenuma prema ileumu

S obzirom na funkcionalnu ovisnost o Na/K-ATPazi, izraženost SGLT1 prati raspodjelu izraženosti Na/K-ATPaze te je najniža u duodenumu, a najviša u ileumu.

12. Izraženost GLUT2 u tankom crijevu svinje najviša je u jejunumu

GLUT2 na proteinskoj razini ima najvišu izraženost u jejunumu, a najnižu u duodenumu. Razlike u obrascu raspodjele GLUT2 duž tankog crijeva između spolova nisu uočene.

13. Glukoza se u najvećoj mjeri apsorbira u središnjem i distalnom dijelu tankog crijeva svinje

Najniža izraženost prijenosnika uključenih u prijenos glukoze u tankom crijevu svinje, Na/K-ATPaze, SGLT1 i GLUT2, u duodenumu pokazuje da se većina apsorpcije glukoze događa u jejunumu i ileumu.

8. POPIS LITERATURE

AFFLECK, J. A., P. A. HELLIWELL, G. L. KELLETT (2003): Immunocytochemical detection of GLUT2 at the rat intestinal brush-border membrane. J. Histochem. Cytochem. 51, 1567-1574.
doi: 10.1177/002215540305101116

AIT-OMAR, A., M. MONTEIRO-SEPULVEDA, C. POITOU, M. LE GALL, A. COTILLARD, J. GILET, K. GARBIN, A. HOULLIER, D. CHÂTEAU, A. LACOMBE, N. VEYRIE, D. HUGOL, J. TORDJMAN, C. MAGNAN, P. SERRADAS, K. CLÉMENT, A. LETURQUE, E. BROT-LAROCHE (2011): GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: A study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. Diabetes 60, 2598-2607.
doi: 10.2337/db10-1740

ALEXANDER, A. N., H. V. CAREY (2001): Involvement of PI 3-kinase in IGF-I stimulation of jejunal Na+-K+-ATPase activity and nutrient absorption. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 280, 222-228.

AMERONGEN, H. M., J. A. MACK, J. M. WILSON, M. R. NEUTRA (1989): Membrane Domains of Intestinal Epithelial Cells : Distribution of Na+,K+-ATPase and the Membrane Skeleton in Adult Rat Intestine during Fetal Development and after Epithelial Isolation. J. Cell Biol. 109, 2129-2138.

ANDERWALD, C., A. GASTALDELLI, A. TURA, M. KREBS, M. PROMINTZER-SCHIFFERL, A. KAUTZKY-WILLER, M. STADLER, R. A. DEFRONZO, G. PACINI, M. G. BISCHOF (2011): Mechanism and Effects of Glucose Absorption during an Oral Glucose Tolerance Test Among Females and Males. J. Clin. Endocrinol. Metab. 96, 515-524.
doi: 10.1210/jc.2010-1398

ASANO, T., T. OGIHARA, H. KATAGIRI, H. SAKODA, H. ONO, M. FUJISHIRO, M. ANAI, H. KURIHARA, Y. UCHIJIMA (2004): Glucose Transporter and Na+/glucose Cotransporter as Molecular Targets of Anti-Diabetic Drugs. Curr. Med. Chem. 11, 2717-2724.

ASCHENBACH, J. R., T. BORAU, G. GÄBEL (2002): Sodium glucose-linked transport in the ruminal epithelium of fallow deer - comparison to sheep. J. Comp. Physiol. B. 172, 561-567.
doi: 10.1007/s00360-002-0283-y

ASCHENBACH, J. R., K. STEGLICH, G. GÄBEL, K. U. HONSCHA (2009): Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. J. Physiol. Biochem. 65, 251-266.
doi: 10.1007/BF03180578

AU, A., A. GUPTA, P. SCHEMBRI, C. I. CHEESEMAN (2002): Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. Biochem. J. 367, 247-254.
doi: 10.1042/BJ20020393

AUGUSTIN, R., E. MAYOUX (2014): Mammalian Sugar Transporters. U: Glucose Homeostasis. Urednik: SZABLEWSKI, L. InTech, Rijeka, Hrvatska, 3-36.
doi: 10.5772/58325

BADY, I., N. MARTY, M. DALLAPORTA, M. EMERY, J. GYGER, D. TARUSSIO, M. FORETZ, B. THORENS (2006): Evidence From Glut2-Null Mice That Glucose Is A Critical Physiological Regulator Of Feeding. Diabetes 55, 988-995.
doi: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1386

BALEN, D., M. LJUBOJEVIĆ, D. BRELJAK, H. BRZICA, V. ŽLENDER, H. KOEPSELL, I. SABOLIĆ (2008). Revised immunolocalization of the Na+-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 295, 475-489.
doi: 10.1152/ajpcell.00180.2008

BALON, T. W. (2012): SGLT and GLUT: are they teammates? Focus on “Mouse SGLT3a generates proton-activated currents but does not transport sugar.” Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 302, C1071-C1072.
doi: 10.1152/ajpcell.00054.2012

BARFULL, A., C. GARRIGA, A. TAULER, J. M. PLANAS (2002): Regulation of SGLT1 expression in response to Na+ intake. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 282, R738-R743.
doi: 10.1152/ajpregu.00263.2001

BATCHELOR, D. J., M. AL-RAMMAHI, A. W. MORAN, J. G. BRAND, X. LI, M. HASKINS, A. J. GERMAN, S. P. SHIRAZI-BEECHEY (2011): Sodium/glucose cotransporter-1, sweet receptor, and disaccharidase expression in the intestine of the domestic dog and cat: two species of different dietary habit. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 300, R67-R75.
doi: 10.1152/ajpregu.00262.2010

BOUDRY, G., C. I. CHEESEMAN, M. H. PERDUE (2007): Psychological stress impairs Na+-dependent glucose absorption and increases GLUT2 expression in the rat jejunal brush-border membrane. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292, R862-R867.
doi: 10.1152/ajpregu.00655.2006

BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

BREVES, G., J. KOCK, B. SCHRÖDER (2007): Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs. Livest. Sci. 109, 4-13.
doi: 10.1016/j.livsci.2007.01.021

BROWN, G. K. (2000): Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency. J. Inherit. Metab. Dis. 23, 237-246.
doi: 10.1023/A:1005632012591

BRZICA, H., D. BRELJAK, M. LJUBOJEVIĆ, D. BALEN, V. MICEK, N. ANZAI, I. SABOLIĆ (2009): Optimal methods of antigen retrieval for organic anion transporters in cryosections of the rat kidney. Arh. Hig. Rada Toksikol. 60, 7-17.
doi: 10.2478/10004-1254-60-2009-1895

BUDDINGTON, R. K., J. M. DIAMOND (1989): Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. Annu. Rev. Physiol. 51, 601-619.

BUDDINGTON, R. K., C. MALO (1996): Intestinal brush-border membrane enzyme activities and transport functions during prenatal development of pigs. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 23, 51-64.
doi: 10.1097/00005176-199607000-00010

BURANT, C. F., S. FLINK, A. M. DEPAOLI, J. CHEN, W. S. LEE, M. A. HEDIGER, J. B. BUSE, E. B. CHANG (1994): Small intestine hexose transport in experimental diabetes increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. J. Clin. Invest. 93, 578-585.
doi: 10.1172/JCI117010

CASPARY, W. (1992): Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. Am. J. Clin. Nutr. 55, 299S-308S.

CHANG WAYHS, M. L., M. B. DE MORAIS, U. F. MACHADO, S. M. NASSAR, U. F. NETO, O. M. SILVÉRIO AMÂNCIO (2011): Transepithelial transport of glucose and mRNA of glucose transporters in the small intestine of rats with iron-deficiency anemia. Nutrition 27, 111-115.
doi: 10.1016/j.nut.2010.07.002

CHARNEY, A. N., M. D. KINSEY, L. MYERS, R. A. GAINNELLA, R. E. GOTS (1975): Na+-K+-activated adenosine triphosphatase and intestinal electrolyte transport. Effect of adrenal steroids. J. Clin. Invest. 56, 653-660.
doi: 10.1172/JCI108135

CHEESEMAN, C. I. (1993): GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. Gastroenterology 105, 1050-1056.

CHEESEMAN, C. I. (2002): Intestinal hexose absorption: transcellular or paracellular fluxes. J. Physiol. 544, 336-336.
doi: 10.1113/jphysiol.2002.029850

CHEN, J. Q., T. R. BROWN, J. RUSSO (2009): Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. Biochim. Biophys. Acta - Molecular Cell Research 1793, 1128-1143.
doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.03.009

CHEN, J., S. WILLIAMS, S. HO, H. LORAINE, D. HAGAN, J. M. WHALEY, J. N. FEDER (2010): Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. Diabetes Ther. 1, 57-92.
doi: 10.1007/s13300-010-0006-4

COON, S., R. KEKUDA, P. SAHA, U. SUNDARAM, W. VIRGINIA (2011): Reciprocal regulation of the primary sodium absorptive pathways in rat intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 300, C496–C505.
doi: 10.1152/ajpcell.00292.2010

CORPE, C. P., M. M. BASALEH, J. AFFLECK, G. GOULD, T. J. JESS, G. L. KELLETT (1996): The regulation of GLUT5 and GLUT2 activity in the adaptation of intestinal brush-border fructose transport in diabetes. Pflugers Arch. 432, 192-201.
doi: 10.1007/s004240050124

CRANE, R. K. (1960): Intestinal Absorption of Sugars. Physiol. Rev. 40, 789-825.

CUI, X.-L., L. JIANG, R. P. FERRARIS. (2003): Regulation of rat intestinal GLUT2 mRNA abundance by luminal and systemic factors. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1612, 178-185.
doi: 10.1016/S0005-2736(03)00129-9

DAHLQVIST, A. (1961): The location of carbohydrases in the digestive tract of the pig. Biochem. J. 78, 282-288.
doi: 10.1042/bj0780282

DESESSO, J. M., C. F. JACOBSON (2001): Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. Food Chem. Toxicol. 39, 209-228.
doi: 10.1016/S0278-6915(00)00136-8

DIAMOND, J., W. KARASOV (1987): Adaptive regulation of intestinal nutrient transporters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2242-2245.

DROZDOWSKI, L., A. THOMSON (2006): Intestinal sugar transport. World J. Gastroenterol. 12, 1657-1670.
doi: 10.3748/wjg.v12.i11.1657

DYER, J., I. S. WOOD, A. PALEJWALA, A. ELLIS, S. P. SHIRAZI-BEECHEY (2002): Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 282, G241-G248.
doi: 10.1152/ajpgi.00310.2001

DŽURBA, A., A. ZIEGELHÖFFER, N. VRBJAR, J. STYK, J. SLEZÁK (1997): Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. Mol. Cell. Biochem. 176, 113-118.
doi: 10.1023/A:1006835214312

ERNST, S. A., S. R. HOOTMAN (1981): Microscopial methods for the localization of Na+,K+-ATPase. Histochem. J. 13, 397-418.

EWART, H. S., A. KLIP (1995): Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 269, C295-C311.

FERRARIS, R. P., J. M. DIAMOND (1993): Crypt/villus site of substrate-dependent regulation of mouse intestinal glucose transporters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5868-5872.
doi: 10.1073/pnas.90.12.5868

FREIRE, A. C., A. W. BASIT, R. CHOUDHARY, C. W. PIONG, H. A. MERCHANT (2011): Does sex matter? The influence of gender on gastrointestinal physiology and drug delivery. Int. J. Pharm. 415, 15-28.
doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.069

GARRIGA, C., N. ROVIRA, M. MORETO, J. M. PLANAS (1999): Expression of Na+-D-glucose cotransporter in brush-border membrane of the chicken intestine Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 276, R627-R631.

GEERING, K. (2008): Functional roles of Na,K-ATPase subunits. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 17, 526-532.
doi: 10.1097/MNH.0b013e3283036cbf

GUILLOTEAU, P., R. ZABIELSKI, H. M. HAMMON, C. C. METGES (2010): Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? Nutr. Res. Rev. 23, 4-22.
doi: 10.1017/S0954422410000077

GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): Textbook of Medical Physiology. 11. izdanje. Elsevier Saunders, Philadelphia (PA), SAD.

HABOLD, C., C. FOLTZER-JOURDAINNE, Y. LE MAHO, J.-H. LIGNOT, H. OUDART (2005): Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. J. Physiol. 566, 575-586.
doi: 10.1113/jphysiol.2005.085217

HALAIHEL, N., D. GERBAUD, M. VASSEUR, F. ALVARADO (1999): Heterogeneity of pig intestinal D-glucose transport systems. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 277, C1130-C1141.

HARMS, V., E. M. WRIGHT (1980): Some characteristics of Na/K-ATPase from rat intestinal basal lateral membranes. J. Membr. Biol. 53, 119-128.
doi: 10.1007/BF01870580

HART, C. D., A. S. FLOZAK, R. A. SIMMONS, J. R. CELL (1998): Modulation of Glucose Transport in Fetal Rat Lung: A Sexual Dimorphism. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 19, 63-70. doi. 10.1165/ajrcmb.19.1.2859

HEDIGER, M. A, M. J. COADY, T. S. IKEDA, E. M. WRIGHT (1987): Expression cloning and cDNA sequencing of the Na+/glucose co-transporter. Nature 330, 379-381. doi: 10.1038/330379a0

HEDIGER, M. A., E. TURK, E. M. WRIGHT (1989): Homology of the human intestinal Na+/glucose and Escherichia coli Na+/proline cotransporters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5748-5752.

HELKE, K. L., M. M. SWINDLE (2013): Animal models of toxicology testing: the role of pigs. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 9, 127-139. doi: 10.1517/17425255.2013.739607

HELLIWELL, P. A., M. G. RUMSBY, G. L. KELLETT (2003): Intestinal Sugar Absorption Is Regulated by Phosphorylation and Turnover of Protein Kinase C βII Mediated by Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Mammalian Target of Rapamycin-dependent Pathways. J. Biol. Chem. 278, 28644-28650. doi: 10.1074/jbc.M301479200

HERRMANN, J., B. SCHRÖDER, S. KLINGER, A. THORENZ, A. WERNER, H. ABEL, G. BREVES (2012): Segmental diversity of electrogenic glucose transport characteristics in the small intestines of weaned pigs. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 163, 161-169. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.05.204

HWANG, E. S., B. A. HIRAYAMA, E. M. WRIGHT (1991): Distribution of the SGLT1 Na+ glucose cotransporter and mRNA along the crypt-villus axis of rabbit small intestine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 1208-1217. doi: 10.1016/0006-291X(91)92067-T

JAVORKOVÁ, V., L. MEZEŠOVA, J. VLKOVIČOVÁ, N. VRBJAR (2009): Acute diabetes mellitus and its influence on renal Na,K-ATPase in both genders Veronika. Gen. Physiol. Biophys. 28, 39-46.

JAVORKOVÁ, V., L. MEZEŠOVA, J. VLKOVIČOVÁ, N. VRBJAR (2010): Influence of sub-chronic diabetes mellitus on functional properties of renal Na(+),K(+)-ATPase in both genders of rats. Gen. Physiol. Biophys. 29, 266-274.

JOOST, H. G., G. I. BELL, J. D. BEST, M. J. BIRNBAUM, M. J. CHARRON, Y. T. CHEN, H. DOEGE, D. E. JAMES, H. F. LODISH, K. H. MOLEY, M. MUECKLER, S. ROGERS, A. SCHÜRMANN, S. SEINO, B. THORENS (2002): Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282, E974-E976.
doi: 10.1152/ajpendo.00407.2001

KALTOFEN, T., M. HAASE, U. H. THOME, M. LAUBE (2015): Male Sex is Associated with a Reduced Alveolar Epithelial Sodium Transport. PLoS ONE, 10, e0136178.
doi: 10.1371/journal.pone.0136178

KELLETT, G. L., P. A. HELLIWELL (2000): The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. Biochem. J. 350, 155-162.
doi: 10.1042/bj3500155

KELLETT, G. L. (2001): The facilitated component of intestinal glucose absorption. J. Physiol. 531, 585-595.
doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x

KELLETT, G. L., E. BROT-LAROCHE (2005): Apical GLUT2 - a major pathway of intestinal sugar absorption. Diabetes 54, 3056-3062.
doi: 10.2337/diabetes.54.10.3056

KELLETT, G. L., E. BROT-LAROCHE, O. J. MACE, A. LETURQUE (2008): Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. Ann. Rev. Nutr. 28, 35-54.
doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518

KELJO, D. J., R. J. MACLEOD, M. H. PERDUE (1985): D-Glucose transport in piglet jejunal brush-border membranes: insights from a disease model. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 249, G751-G760.

KÖKSOY, A. A. (2002): Na+, K+–ATPase: a review. J. Ankara Med. Sch. 24, 73-82.

KRSTANOVIĆ, J., M. DOMAĆINOVIĆ, M. PAVIĆ, M. ĐIDARA, M. ŠPERANDA (2013): Perinatalni razvoj probavnog sustava svinje. Poljoprivreda 19, 59-64.

LEE, W. S., Y. KANAI, R. G. WELLS, M. A. HEDIGER (1994): The high affinity Na+/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. J. Biol. Chem. 269, 12032-12039.

LEHMANN, A., P. J. HORNBY (2016): Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 310, G887-G898.
doi: 10.1152/ajpgi.00068.2016

LESCALE-MATYS, L., J. DYER, D. SCOTT, T. C. FREEMAN, E. M. WRIGHT, S. P. SHIRAZI-BEECHEY (1993): Regulation of the ovine intestinal Na+/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. Biochem. J. 291, 435-440.
doi: 10.1042/bj2910435

LEVIN, R. J., O. KOLDOVSKÝ, J. HOSKOVÁ, V. JIRSOVÁ, J. UHER (1968): Electrical activity across human foetal small intestine associated with absorption processes. Gut 9, 206-213.

LI, Q., A. MANOLESCU, M. RITZEL, S. YAO, M. SLUGOSKI, J. D. YOUNG, X. Z. CHEN, C. I. CHEESEMAN (2004): Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 287, G236–G242.
doi: 10.1152/ajpgi.00396.2003

LINDBERG, T. (1966). Intestinal dipeptidases: characterization, development and distribution of intestinal dipeptidases of the human foetus. Clin. Sci. 30, 505-515.

LONG, W., C. I. CHEESEMAN (2015): Structure of, and functional insight into the GLUT family of membrane transporters. Cell Health Cytoskelet. 2015, 167-183.

LOO, D. D. F., E. M. WRIGHT, T. ZEUTHEN (2002): Water pumps. J. Physiol. 542, 53-60. doi: 10.1113/jphysiol.2002.018713

MADARA, J. L., J. R. PAPPENHEIMER (1987): Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. J. Membr. Biol. 100, 149-164.

LJUBOJEVIĆ, M., D. BALEN, D. BRELJAK, M. KUŠAN, N. ANZAI, A. BAHN, G. BURCKHARDT, I. SABOLIĆ (2007): Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. Am. J.Physiol. Renal Physiol. 292, F361-F372. doi: 10.1152/ajprenal.00207.2006.

MALO, C., A. BERTELOOT (1987): Proximo-distal gradient of Na+-dependent D-glucose transport activity in the brush border membrane vesicles from the human fetal small intestine. FEBS Lett. 220, 201-205.
doi: 10.1016/0014-5793(87)80903-1

MANOLESCU, A. R., K. WITKOWSKA, A. KINNAIRD, T. CESSFORD, C. I. CHEESEMAN (2007): Facilitated Hexose Transporters: New Perspectives on Form and Function. Physiology 22, 234-240.
doi: 10.1152/physiol.00011.2007

MEDDINGS, J. B., D. DESOUZA, M. GOEL, S. THIESEN (1990): Glucose transport and microvillus membrane physical properties along the crypt-villus axis of the rabbit. J. Clin. Invest. 85, 1099–1107.
doi: 10.1172/JCI114541

MIKOČ, A. (2007): Imunodetekcija proteina na membrani. U: Metode u molekularnoj biologiji.1. izdanje. Urednica: AMBRIOVIĆ RISTOV, A. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 590-594.

MILLER, E. R., D. E. ULLREY (1987): The pig as a model for human nutrition. Ann. Rev. Nutr. 7, 361-382.
doi: 10.1146/annurev.nu.07.070187.002045

MIRCHEFF, A K., E. M. WRIGHT (1976): Analytical isolation of plasma membranes of intestinal epithelial cells: identification of Na, K-ATPase rich membranes and the distribution of enzyme activities. J. Membr. Biol. 28, 309-333.

MIYAMOTO, K., K. HASE, Y. TAKETANI, H. MINAMI, T. OKA, Y. NAKABOU, H. HAGIHIRA (1991): Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 1110-1117.
doi: 10.1016/0006-291X(91)92053-M

MIYAMOTO, K., K. HASE, Y. TAKETANI, H. MINAMI, T. OKA, Y. NAKABOU, H. HAGIHIRA (1992a): Developmental changes in intestinal glucose transporter mRNA levels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 626-631.
doi: 10.1016/0006-291X(92)90528-S

MIYAMOTO, K., T. TAKAGI, T. FUJII, T. MATSUBARA, K. HASE,Y. TAKETANI, T. OKA, H. MINAMI, Y. NAKABOU (1992b): Role of liver-type glucose transporter (GLUT2) in transport across the basolateral membrane in rat jejunum. FEBS Lett. 314, 466-470.
doi: 10.1016/0014-5793(92)81528-T

MIYAMOTO, K., K. HASE, T. TAKAGI, T. FUJII, Y. TAKETANI, H. MINAMI, T. OKA, Y. NAKABOU (1993): Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. Biochem. J. 295, 211-215.
doi: 10.1042/bj2950211

MONTAGNE, L., G. BOUDRY, C. FAVIER, I. LE HUËROU-LURON, J. P. LALLÈS, B. SÈVE (2007): Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. Br. J. Nutr. 97, 45-47.
doi: 10.1017/S000711450720580X

MORAN, A. W., M. A. AL-RAMMAHI, D. K. ARORA, D. J. BATCHELOR, E. A. COULTER, C. IONESCU, D. BRAVO, S. P. SHIRAZI-BEECHEY (2010): Expression of Na+/glucose co-transporter 1 (SGLT1) in the intestine of piglets weaned to different concentrations of dietary carbohydrate. Br. J. Nutr. 104, 647-55.
doi: 10.1017/S0007114510000954

NAFTALIN, R. J. (2014): Does apical membrane GLUT2 have a role in intestinal glucose uptake? F1000Res. 3, 1-33.
doi: 10.12688/f1000research.5934.1

NAGAI, K., S. YOSHIDA, H. KONISHI (2014): Gender differences in the gene expression profiles of glucose transporter GLUT class I and SGLT in mouse tissues. Pharmazie 69, 856-859.
doi: 10.1691/ph.2014.4647

PÁCHA, J. (2000): Development of intestinal transport function in mammals. Physiol. Rev. 80, 1633-1667.

PAPPENHEIMER, J. R., K. Z. REISS (1987): Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. J. Membr. Biol. 100, 123-136.

PAPPENHEIMER, J. R., C. C. MICHEL (2003): Role of villus microcirculation in intestinal absorption of glucose: coupling of epithelial with endothelial transport. J. Physiol. 553, 561-574.
doi: 10.1113/jphysiol.2003.043257

PATTERSON, J. K., X. G. LEI, D. D. MILLER (2008): The Pig as an Experimental Model for Elucidating the Mechanisms Governing Dietary Influence on Mineral Absorption. Exp. Biol. Med. (Maywood) 233, 651-664.
doi: 10.3181/0709-MR-262

PEERCE, B. E., E. M. WRIGHT (1984): Conformational changes in the intestinal brush border sodium- glucose cotransporter labeled with fluorescein isothiocyanate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2223-2226.

POMERLEAU, E. T., P. M. MCKEIGUE, N. CHATURVEDI (1999): Relationships of Fasting and Postload Glucose Levels to Sex and Alcohol Consumption. Are American Diabetes Association criteria biased against detection of diabetes in women? Diabetes Care 22, 430-433. doi: 10.2337/diacare.22.3.430

POND, W. G., K. A. HOUPT (1978): The Biology of the Pig. Cornell University Press, Ithaca (NY), SAD

PUCHAL, A A, R. K. BUDDINGTON (1992): Postnatal development of monosaccharide transport in pig intestine. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 262, G895-G902.

QUINTAS, L. E., L. B. LOPEZ, C. SOUCCAR, F. NOEL (1997): Na+/K+-ATPase Density is Sexually Dimorphic in the Adult Rat Kidney. Ann. N. Y. Acad. Sci. 834, 552-554.
doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb52316.x

RAJASEKARAN, S. A., A. K. RAJASEKARAN (2009): Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. Frontiers in Bioscience 14, 2130-2148.

ROCAFULL, M. A., L. E. THOMAS, J. R. DEL CASTILLO (2012): The second sodium pump: from the function to the gene. Pflugers Arch. 463, 755-777.
doi: 10.1007/s00424-012-1101-3

ROSE, A. M., R. VALDES (1994): Understanding the sodium pump and its relevance to disease. Clin. Chem. 40, 1674-1685.

ROWLING, P. J. E., F. V. SEPULVEDA (1984): The distribution of (Na++K+)-ATPase along the villus crypt-axis in the rabbit small intestine. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 771, 35-41.

SABOLIĆ, I., M. ŠKARICA, V. GORBOULEV, M. LJUBOJEVIĆ, D. BALEN, C. M. HERAK-KRAMBERGER, H. KOEPSELL (2006): Rat renal glucose transporter SGLT1 exhibits zonal distribution and androgen-dependent gender differences. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 290, F913-F926.
doi: 10.1152/ajprenal.00270.2005

SABOLIĆ, I., M. LJUBOJEVIĆ, D. BALEN (2007): Posredna imunofluorescencija: metode otkrivanja antigena za vezanje primarnog protutijela u fiksiranim rezovima tkiva ili stanicama. U: Metode u molekularnoj biologiji.1. izdanje. Urednica: AMBRIOVIĆ RISTOV, A. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 618-622.

SABOLIĆ, I., I. VRHOVAC, D. B. EROR, M. GERASIMOVA, M. ROSE, D. BRELJAK, M. LJUBOJEVIĆ, H. BRZICA, A. SEBASTIANI, S. C. THAL, C. SAUVANT, H. KIPP, V. VALLON, H. KOEPSELL (2012): Expression of Na+-D-glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 302, C1174-C1188.
doi: 10.1152/ajpcell.00450.2011.

SCHEEPERS, A., H. G. JOOST, A. SCHÜRMANN (2004): The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. 28, 364-371.
doi: 10.1177/0148607104028005364

SCOW, J. S., C. W. IQBAL, T. W. JONES, H. G. QANDEEL, Y. ZHENG, J. A. DUENES, M. NAGAO, S. MADHAVAN, M. G. SARR (2011): Absence of Evidence of Translocation of GLUT2 to the Apical Membrane of Enterocytes in Everted Intestinal Sleeves. J. Surg. Res. 167, 56-61.
doi: 10.1016/j.jss.2010.04.026

SERHAN, M. F., S. I. KREYDIYYEH (2010): Insulin down-regulates the Na+/K+ ATPase in enterocytes but increases intestinal glucose absorption. Gen. Comp. Endocrinol. 167, 228-233.
doi: 10.1016/j.ygcen.2010.03.010

SHIRAZI-BEECHEY, S. P. (1995): Molecular Biology of Intestinal Glucose Transport. Nutr. Res. Rev. 8, 27-41.
doi: 10.1079/NRR19950005

SIEBER, F. E., P. HURN, N. J. ALKAYED, R. J. TRAYSTMAN, R. J. (2001): Gender-based Differences in Na+-K+ Adenosine Triphosphatase Activity Occur in the Microcirculation of the Diabetic Rat Brain. Anesthesiology 94, 372-375.

SKOU, J. C. (1957): The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta 23, 394-401.
doi: 10.1016/0006-3002(57)90343-8

SKOU, J. C., M. ESMANN (1992): The Na,K-ATPase. J. Bioenerg. Biomembr. 24, 249-261.

SMITH, M. W. (1988): Postnatal development of transport function in the pig intestine. Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 90, 577-582.
doi: 10.1016/0300-9629(88)90670-6

SRICHAMROEN, A. (2013): Intestinal Transport of Monosaccharides. Naresuan University Journal 15, 127-135.

SWEENEY, G., A. KLIP (1998): Regulation of the Na+/K+- ATPase by insulin: Why and how? U: Insulin Action. 1. izdanje. Urednici: SRIVASTAVA, A. K., B. I. POSNER. Springer US, Boston (MA), SAD, 121-133.

SWINDLE, M. M., C. A. SMITH (2008): Swine in Biomedical Research. U: Sourcebook of Models for Biomedical Research. 1. Izdanje. Urednik: CONN, P.M. Humana Press Inc. Totowa (NJ), SAD, 233-239.

TAKATA, K., T. KASAHARA, M. KASAHARA, O. EZAKI, H. HIRANO (1992): Immunohistochemical localization of Na+-dependent glucose transporter in rat jejunum. Cell Tissue Res. 267, 3-9.

THERIEN, A G., R. BLOSTEIN (2000): Mechanisms of sodium pump regulation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 279, C541-C566.

THORENS, B., M. J. CHARRON, H. F. LODISH (1990a): Molecular Physiology of Glucose Transporters. Diabetes Care 13, 209-218.
doi: 10.2337/diacare.13.3.209

THORENS, B., Z. Q. CHENG, D. BROWN, H. F. LODISH (1990b): Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 259, C279-C285.

THORENS, B., H. F. LODISH, D. BROWN (1990c): Differential localization of two glucose transporter isoforms in rat kidney. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 259, C286-C294.

THORENS, B., M. MUECKLER (2010): Glucose transporters in the 21st Century. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298, 141-145.
doi: 10.1152/ajpendo.00712.2009

THORENS, B. (2015): GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. Diabetologia 58, 221-232.
doi: 10.1007/s00125-014-3451-1

THORSEN, K., T. DRENGSTIG, P. RUOFF (2014): Transepithelial glucose transport and Na+/K+ homeostasis in enterocytes: an integrative model. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 307, C320-C337.
doi: 10.1152/ajpcell.00068.2013

ULDRY, M., M. IBBERSON, M. HOSOKAWA, B. THORENS (2002): GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. FEBS Lett. 524, 199–203.
doi: 10.1016/S0014-5793(02)03058-2

URAKAMI, Y., M. OKUDA, H. SAITO, K. INUI (2000): Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. FEBS Lett. 473, 173-176.
doi: 10.1016/S0014-5793(00)01525-8

VAN DER WIELEN, N., M. VAN AVESAAT, N. J. W. DE WIT, J. T. W. E. VOGELS, F. TROOST, A. MASCLEE, S. J. KOOPMANS, J. VAN DER MEULEN, M. V. BOEKSCHOTEN, M. MÜLLER, H. F. J. HENDRIKS, R. F. WITKAMP, J. MEIJERINK (2014): Cross-Species Comparison of Genes Related to Nutrient Sensing Mechanisms Expressed Along the Intestine. PloS ONE, 9, e107531.
doi: 10.1371/journal.pone.0107531

VEGA, Y. M., A. A. PUCHAL, R. K. BUDDINGTON (1992): Intestinal Amino Acid and Monosaccharide Transport in Suckling Pigs Fed Milk Replacers with Different Sources of Carbohydrate. J. Nutr. 122, 2430-2439.

WEIDMANN, P., P. FERRARI (1991): Central Role of Sodium in Hypertension in Diabetic Subjects. Diabetes Care 14, 220-232.
doi: 10.2337/diacare.14.3.220

WHO (2017): Diabetes. [citirano 31.08.2017.]
dostupno: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/

WILD, G. E., D. MURRAY (1992): Alterations in quantitative distribution of Na,K-ATPase activity along crypt-villus axis in animal model of malabsorption characterized by hyperproliferative crypt cytokinetics. Dig. Dis. Sci. 37, 417-425.

WILD, G. E., J. A. THOMPSON, L. SEARLES, R. TURNER, J. HASAN, A. B. THOMSON (1999): Small Intestinal Na+,K+-Adenosine Triphosphatase Activity and Gene Expression in Experimental Diabetes Mellitus. Dig. Dis. Sci. 44, 407-414.

WILD S. H., G. ROGLIC, A. GREEN, R. SICREE, H. KING (2004): Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projection for 2030. Diabetes Care 27, 1047-–1053.
doi: 10.2337/diacare.27.5.1047

WOOD, I. S., P. TRAYHURN (2003): Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Br. J. Nutr. 89, 3-9.
doi: 10.1079/BJN2002763

WOODWARD, A. D., P. R. REGMI, M. G. GÄNZLE, T. A. T. G. VAN KEMPEN, R. T. ZIJLSTRA (2012): Slowly digestible starch influences mRNA abundance of glucose and short-chain fatty acid transporters in the porcine distal intestinal tract. J. Anim. Sci. 90, 80-82.
doi: 10.2527/jas.53877

WRIGHT, E. M., J. R. HIRSCH, D. D. F. LOO, G. A. ZAMPIGHI (1997): Regulation of Na+/glucose cotransporters. J. Exp. Biol. 200, 287-293.

WRIGHT, E. M., D. D. F. LOO (2000): Coupling between Na+, Sugar, and Water Transport across the Intestine. Ann. N. Y. Acad. Sci. 915, 54-66.
doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05223.x

WRIGHT, E. M., M. G. MARTÍN, E. TURK (2003). Intestinal absorption in health and disease - sugars. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 17, 943-956.
doi: 10.1016/S1521-6918(03)00107-0

WRIGHT, E. M., D. D. F. LOO, B. A. HIRAYAMA, E. TURK (2004): Surprising Versatility of Na+-Glucose Cotransporters: SLC5. Physiology 19, 370-376.
doi: 10.1152/physiol.00026.2004

WRIGHT, E. M., E. TURK. (2004): The sodium/glucose cotransport family SLC5. Pflugers Arch. 447, 510-518.
doi: 10.1007/s00424-003-1063-6

WRIGHT, E. M., B. A. HIRAYAMA, D. D. F. LOO (2007): Active sugar transport in health and disease. J. Intern. Med. 261, 32-43.
doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01746.x

WRIGHT, E. M., D. D. F. LOO, B. A. HIRAYAMA (2011): Biology of Human Sodium Glucose Transporters. Physiol. Rev. 91, 733-794.
doi: 10.1152/physrev.00055.2009

YOSHIDA, A., K. TAKATA, T. KASAHARA, T. AOYAGI, S. SAITO, H. HIRANO (1995): Immunohistochemical localization of Na+-dependent glucose transporter in the rat digestive tract. Histochem. J. 27, 420-426.

YOSHIKAWA, T., R. INOUE, M. MATSUMOTO, T. YAJIMA, K. USHIDA, T. IWANAGA (2011): Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. Histochem. Cell Biol. 135, 183-194.
doi: 10.1007/s00418-011-0779-1

YU, S. P. (2003). Na+, K+-ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. Biochem. Pharmacol. 66, 1601-1609.
doi: 10.1016/S0006-2952(03)00531-8

ZHAO, F. Q., E. K. OKINE, C. I. CHEESEMAN, S. P. SHIRAZI-BEECHEY, J. J. KENNELLY (1998): Glucose transporter gene expression in lactating bovine gastrointestinal tract. J. Anim. Sci. 76, 2921-2929.
doi: 10.2527/1998.76112921x

ZHAO, F. Q., A. F KEATING (2007): Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. Curr. Genomics, 8, 113-128.
doi: 10.2174/138920207780368187

ZHENG, Y., J. S. SCOW, J. A. DUENES, M. G. SARR (2012): Mechanisms of Glucose Uptake in Intestinal Cell Lines: Role of GLUT2. Surgery 151, 13–25.
doi: 10.1016/j.surg.2011.07.010

ZUO, J., Z. HUANG, A. ZHI, S. ZOU, X. ZHOU, F. DAI, H. YE, D. FENG (2010): Cloning and Distribution of Facilitative Glucose Transporter 2 (SLC2A2) in Pigs. Asian-Australas. J. Anim. Sci., 23, 1159-1165.
doi: 10.5713/ajas.2010.90551

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Mirela Pavić rođena je 11. srpnja 1986. godine u Osijeku gdje je završila osnovnu školu i Prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2005. godine gdje je diplomirala 2012. godine. Tijekom studija bila je demonstrator u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju te u Klinici za porodništvo i reprodukciju. Dobitnica je šest Dekanovih nagrada i jedne Posebne Rektorove nagrade. Akademske godine 2012./2013. upisala je poslijediplomski doktorski studij iz Veterinarskih znanosti na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Od 1. ožujka 2012. godine zaposlena je kao znanstveni novak na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku na projektu MZO-a „Prirodni imunomodulatori i antioksidansi u optimalizaciji proizvodnje svinja“ voditeljice prof. dr. sc. Marcele Šperanda. Od 1. rujna 2016. godine zaposlena je kao asistentica na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Objavila je 12 znanstvenih radova, od čega su dva citirana u CC i SCI Expanded. Aktivno je sudjelovala na 15 međunarodnih kongresa. Sudjeluje u nastavi na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju na predmetu: „Anatomija s organogenezom domaćih životinja I, II, III“, „Klinička anatomija“ te na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju Veterinarske medicine koji se izvodi na engleskom jeziku na predmetu „Anatomy with Organogenesis of Domestic Animals I, II, III“.

Popis objavljenih radova

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. ĐIDARA, M., N. POLJIČAK MILAS, S. MILINKOVIĆ-TUR, T. MAŠEK, J. ŠURAN, **M. PAVIĆ**, M. KARDUM, M. ŠPERANDA (2015): Immune and oxidative response to linseed in the diet of periparturient Holstein cows. Animal 9, 1349-1354.

2. MIHELIĆ, D., **M. PAVIĆ**, Z. HINCAK (2013): A Craniometrical Analysis of The Early Bronze Age Dogs from Vučedol site (East Slavonia, Croatia). Coll. Antropol. 37, 239-244.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. GRČEVIĆ, M., Z. KRALIK, G. KRALIK, D. GALOVIĆ, **M. PAVIĆ** (2016): The effect of lutein additives on biochemical parameters in blood of laying hens. Poljoprivreda 22, 34-38.

2. KLARIĆ, I., M. DOMAĆINOVIĆ, **M. PAVIĆ**, I. MIŠKULIN, M. MIŠKULIN, Z. STEINER (2016): Upotreba propolisa i pčelinjeg peluda u hranidbi pilića - prirodan način zaštite zdravlja potrošača. Hrana u zdravlju i bolesti 5, 37-43.

3. ZOBEL, R., **M. PAVIĆ**, I. ŠKET, D. GRAČNER (2015): Utjecaj pasmine na vrijeme ovulacije u krava. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 46, 181-185.

4. KLARIĆ, I., M. DOMAĆINOVIĆ, **M. PAVIĆ**, Z. STEINER, D. SAMAC, LJ. PASTUOVIĆ (2014): Utjecaj propolisa i pčelinje peludi na odabrane pokazatelje u sadržaju crijeva te fecesu tovnih pilića. Krmiva: časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme 56, 99-108.

5. VUKŠIĆ, N., M. ŠPERANDA, A. GROSS BOŠKOVIĆ, **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA (2014): Teški metali u mesu divljači. Meso: prvi hrvatski časopis o mesu 16, 45-53.

6. KRSTANOVIĆ, J., M. DOMAĆINOVIĆ, **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA, M. ŠPERANDA (2013): Perinatalni razvoj probavnog sustava svinje. Poljoprivreda 19, 59-64.

7. ŠPERANDA, M., T. ŠPERANDA, M. ĐIDARA, Z. ANTUNOVIĆ, M. DOMAĆINOVIĆ, D. SAMAC, J. NOVOSELEC, **M. PAVIĆ** (2013): Efficiency of hydrolyzed brewery yeast (Progut®) in weaned piglet's diet. Poljoprivreda 19, 70-75.

8. VUKŠIĆ, N., T. FLORIJANČIĆ, I. BOŠKOVIĆ, M. ĐIDARA, **M. PAVIĆ**, M. ŠPERANDA (2013): Koncentracija adrenalina u serumu divlje svinje (Sus scrofa L.) nakon ponovljenog smrzavanja, određena ELISA metodom. Poljoprivreda 19, 36-39.

9. VUKŠIĆ, N., **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA, J. JURČEVIĆ, M. ŠPERANDA (2013): Interakcija teških metala sa selenom u životinjskom organizmu. Krmiva: časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme 55, 189-195.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. LJUBOJEVIĆ, M., W. GOESSLER, M. MILIĆ, M. ĆURLIN, V. MICEK, I. PAVIČIĆ, **M. PAVIĆ**, I. VINKOVIĆ VRČEK (2015): Distribution of silver in organs of Wistar rats after chronic exposure to silver nanoparticles. J. Trace Elem. Med. Biol. 18.-22. listopad, Srebreno, Hrvatska, 23-23.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. KLARIĆ, I., M. DOMAĆINOVIĆ, **M. PAVIĆ**, I. MIŠKULIN, M. MIŠKULIN, Z. STEINER (2016): Učinci propolisa i pčelinjeg peluda na mikroorganizme u kloakama tovnih pilića. Hranom do zdravlja - 9. međunarodni znanstveno-stručni skup, 13. listopad, Osijek, Hrvatska, 79-79.

2. VUKŠIĆ, N., **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA, J. JURČEVIĆ, M. ŠPERANDA (2014): Interakcija teških metala sa selenom. 21. međunarodno savjetovanje KRMIVA 2014, 4.-6. lipnja, Opatija, Hrvatska, 66-67.

3. ŠPERANDA, T., G. KRALIK, Z. KOZARIĆ, **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA, M. ŠPERANDA (2013): Organski selen u hrani svinja mijenja histološku kompoziciju svinjskog mesa. 20. međunarodno savjetovanje KRMIVA 2013, 5.-7. lipnja, Opatija, Hrvatska, 113-113.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

1. KLARIĆ, I., M. DOMAĆINOVIĆ, D. GALOVIĆ, **M. PAVIĆ**, M. RONTA, Z. STEINER (2017): Menta (*Mentha piperita*) u hranidbi domaćih životinja. 52. hrvatski i 12. međunarodni simpozij agronoma, 12.-17. veljače, Dubrovnik, Hrvatska, 518-522.

2. GRČEVIĆ, M., Z. KRALIK, G. KRALIK, Ž. RADIŠIĆ, **M. PAVIĆ** (2016): Production characteristics and some biochemical parameters in blood of laying hens fed mixtures with added lutein. 51. hrvatski i 11. međunarodni simpozij agronoma, 15.-18. veljače, Opatija, Hrvatska, 329-333.

3. JURIĆ, M., M. ŠPERANDA, M. DOMAĆINOVIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA (2014): Metabolički profil holštajn krava u prijelaznom razdoblju. 49. hrvatski i 9. međunarodni simpozij agronoma, 16.-21. veljače, Dubrovnik, Hrvatska, 575-579.

4. KLARIĆ, I., M. DOMAĆINOVIĆ, **M. PAVIĆ**, Z. STEINER, M. RONTA, LJ. PASTUOVIĆ (2014): Primjena propolisa u hranidbi domaćih životinja. 49. hrvatski i 9. međunarodni simpozij agronoma, 16.-21. veljače, Dubrovnik, Hrvatska, 585-589.

5. ŠPERANDA, M., T. ŠPERANDA, M. ĐIDARA, B. HABRUN, H. VALPOTIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, J. NOVOSELEC, M. DOMAĆINOVIĆ, **M. PAVIĆ** (2013): Immune system activation with vaccine and immunomodulator in weaned piglets 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma, 17.-22. veljače, Dubrovnik, Hrvatska, 795-799.

6. ANTUNOVIĆ, Z., M. ŠPERANDA, J. NOVOSELEC, M. MISLAV, Ž. KLIR, **M. PAVIĆ** (2012): Haematological parameters and acid-base balance of goat kids in organic breeding. The First International Symposium on Animal Science, 8.-10. studeni, Beograd, Srbija, 851-864.

7. **PAVIĆ, M.**, K. KANISEK, M. ĐIDARA, M. GRČEVIĆ, M. DOMAĆINOVIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, Z. KRALIK, M. ŠPERANDA (2012): The role of iron in the innate immune system. The First International Symposium on Animal Science, 8.-10. studeni, Beograd, Srbija, 838-845.

8. STRELEC, I., B. ŠARKANJ, D. BEŠLO, D. AGIĆ, M. ĐIDARA, M. ŠPERANDA, **M. PAVIĆ** (2012): Oxidoreductive enzyme activities in erythrocytes and plasma of lactating dairy cows. The First International Symposium on Animal Science, 8.-10. studeni, Beograd, Srbija, 41-48.

9. ŠPERANDA, M., M. ĐIDARA, D. SOLIĆ, M. DOMAĆINOVIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, P. MIJIĆ, T. BOBIĆ, **M. PAVIĆ** (2012): Usefulness of urea and protein concentrations in milk and blood as indicators of nitrogen. 6th Central European Congress on Food, 23.-26. svibnja, Novi Sad, Srbija, 573-573.

Sažeci u zbornicima skupova

1. ĐURAS, M., T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, **M. PAVIĆ**, S. KUŽIR (2017): Anatomy and histology courses of veterinary medicine in English language at University of Zagreb. 9th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists, 12.-14. srpnja, Brno, Češka, 26-27.

2. ŠPERANDA, M., M. ĐIDARA, **M. PAVIĆ**, V. GANTNER (2015): Correlation between BHB and NEFA concentration in early lactation period. Third DairyCare Conference 2015, 5.-6. listopada, Zadar, Hrvatska, 25-25.

3. ĐIDARA, M., M. ŠPERANDA, **M. PAVIĆ** (2014): Acid base balance as a predictor of metabolic or oxidative stress in periparturient dairy cows. First DairyCare Conference 2014, 22.-23. kolovoza, Kopenhagen, Danska, 40-40.

4. ŠPERANDA, M., M. KOVACS, V. HALAS, Z. LONČARIĆ, **M. PAVIĆ**, M. ĐIDARA (2014): Antioxidative status of rats fed with biofortificated wheat wit selenium. 2nd International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology - Fundamentals of Medicine, 16.-17. lipnja, Zagreb, 33-33.

5. VUKŠIĆ, N., T. FLORIJANČIĆ, I. BOŠKOVIĆ, M. ĐIDARA, **M. PAVIĆ**, M. ŠPERANDA (2014): Koncentracija epinefrina u serumu divlje svinje (*Sus scrofa* L.) u uvjetima stresa. 49. hrvatski i 9. međunarodni simpozij agronoma, 16.-21. veljače, Dubrovnik, Hrvatska, 160-161.

6. ĐIDARA, M., S. TOMLJENOVIĆ, N. POLJIČAK-MILAS, T. MAŠEK, M. DOMAĆINOVIĆ, T. ŠPERANDA, J. NOVOSELEC, **M. PAVIĆ**, M. ŠPERANDA (2013): Poboljšanje kakvoće mlijeka hranidbom krava lanenim sjemenom 20. međunarodno savjetovanje KRMIVA 2013, 5.-7. lipnja, Opatija, Hrvatska, 130-131.

7. **PAVIĆ, M.**, A. PETAK, S. TKALČIĆ (2010): Verminous Pneumonia in California Sea Lions: Correlation between Gross and Histopathological Lesions. 21st Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, 4.-5. lipnja, Zagreb, Hrvatska, 228-229.

8. PETAK, A., **M. PAVIĆ**, S. TKALČIĆ (2010): Nasal Mites and Associated Lesions in the Upper Respiratory Tract of California Sea Lions (*Zalophus californianus*). 21st Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, 4.-5. lipnja, Zagreb, Hrvatska. 234-243.

9. **PAVIĆ, M.**, A. PETAK, A. BECK, J. KUSAK, S. ĆURKOVIĆ, R. BECK (2009): Učestalost i proširenost protozoa *Leishmania infantum* u vukova (*Canis lupus*) na području Republike Hrvatske. Znanstveno stručni sastanak Veterinarska znanost i struka, 1.-2. listopada, Zagreb, Hrvatska, 68-69.