# Utjecaj taninske kiseline na izražaj koneksina 45 u bubregu štakora oštećenom kroničnom hiperglikemijom

**Šarić, Mia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:134876

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**
**I**
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Mia Šarić**

# UTJECAJ TANINSKE KISELINE NA IZRAŽAJ KONEKSINA 45 U BUBREGU ŠTAKORA OŠTEĆENOM KRONIČNOM HIPERGLIKEMIJOM

**Diplomski rad**

**Akademska godina: 2015./2016.**

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

**Split, listopad 2016.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**
**I**
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Mia Šarić**

# UTJECAJ TANINSKE KISELINE NA IZRAŽAJ KONEKSINA 45 U BUBREGU ŠTAKORA OŠTEĆENOM KRONIČNOM HIPERGLIKEMIJOM

**Diplomski rad**

**Akademska godina: 2015./2016.**

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

**Split, listopad 2016.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

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

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

# UTJECAJ TANINSKE KISELINE NA IZRAŽAJ KONEKSINA 45 U BUBREGU ŠTAKORA OŠTEĆENOM KRONIČNOM HIPERGLIKEMIJOM

Mia Šarić, 33

**Sažetak:** Cilj ovog diplomskog rada je dokazati potencijalni negativan učinak taninske kiseline na izražaj koneksina 45 u bubregu štakora oštećenog kroničnom hiperglikemijom, kako bi se što bolje mogli kritički osloniti na povoljna djelovanja i uporabu taninske kiseline u liječenju mnogobrojnih bolesti. Istraživanje koje je trajalo dvadeset tjedana provedeno je na dvanaest muških štakora soja Wistar. Štakori su podijeljeni u tri skupine po četiri štakora. Skupine su formirane na osnovu napitaka koje su štakori konzumirali. Prema dobivenim rezultatima 20-tog tjedna eksperimenta uočeno je da je skupina štakora koji su konzumirali saharozu u pitkoj vodi (30%) imala značajan porast glukoze u krvi u odnosu na kontrolnu grupu, a porast glukoze u krvi je bio manji dodatkom taninske kiseline (0,1%). Dodatak taninske kiseline (0,1% u vodi za piće; Sah/TK skupina) rezultirao je smanjenjem tjelesne mase štakora. Patohistološki nalaz ukazuje na oštećenja bubrega uzrokovana hiperglikemijom, dok su oštećenja jače izražena u Sah/TK skupini. Analizom mikrofotografija utvrdili smo da hiperglikemija uzrokuje smanjeni izražaj koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega, a dodatkom taninske kiseline to smanjenje postaje statistički značajno ($p<0,05$). Temeljem dobivenih rezultata zaključili smo da taninska kiselina u kombinaciji s kroničnom hiperglikemijom u primjenjenoj dozi od 0.1% u vodi za piće oštećuje bubrege, te rezultira značajnim padom izražaja koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima štakora.

**Ključne riječi:** šećerna bolest tip 2, taninska kiselina, koneksini, kronična hiperglikemija

**Rad sadrži:** 44 stranice, 6 slika, 70 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med. - predsjednik
2. doc. dr. sc. Sandra Kostić, mag. ing. mol. biotech. - član
3. doc. dr. sc. Natalija Filipović, dr. med. vet. - član-mentor

**Datum obrane:** 14. listopada 2016.

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**GRADUATE THESIS**

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

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

# THE INFLUENCE OF THE TANNIC ACID ON THE EXPRESSION OF THE CONNEXINS 45 IN A RAT KIDNEY DAMAGED BY THE CHRONIC HYPERGLYCEMIA

Mia Šarić, 33

**Summary:** The aim of this thesis was to demonstrate the potential negative effect of the tannic acid on the expression of connexin 45 in rat kidney damaged by the chronic hyperglycemia, due to a need for critical assessment of the positive effects of the use of tannic acid in the treatment of many diseases. Twelve male Wistar rats were used in the trial over a period of twenty weeks. The rats were divided into three groups of four rats. The groups were formed based on beverages consumed by the rats. At the end of this 20-week experiment it was observed that the group of rats that consumed sucrose in drinking water (30%) had a significant increase in blood glucose level compared to the control group which consumed drinking water. In the third group, where tannic acid along with the sucrose (0,1% of tannic acid; Sah/TK group) was added in a drinking water, blood glucose levels were less increased than in the group that consumed sucrose in water. Also consumption of tannic acid (0,1%) had a positive effect on the weight reduction. Pathohistologically, we observed damage of the kidneys caused by the hyperglycemia, while damage was more expressed in the Sah/TK group. Analysis of the microphotographs showed that hyperglycemia caused reduced expression of connexin 45 in the proximal tubules of the kidney, and the addition of the tannic acid made the reduction statistically significant ($p < 0.05$). Based on the results, we concluded that the tannic acid in combination with the chronic hyperglycemia, in the dosage of 0,1% in drinking water, damages the kidneys. We also concluded that tannic acid in combination with the chronic hyperglycemia significantly decreases the expression of the connexin 45 in the proximal tubules of the rat kidney.

**Key words:** diabetes mellitus type 2, tannic acid, connexins , chronic hyperglycemia

**Thesis contains:** 44 pages, 6 figures, 70 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

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

**Defence date:** October 14, 2016

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

**SADRŽAJ**


**1. UVOD ..... 1**

1.1. Šećerna bolest tip 1 ..... 3

1.2. Šećerna bolest tip 2 ..... 4

1.3. Komplikacije ..... 4

1.4. Posljedice hiperglikemije u bubrezima ..... 5

1.5. Taninska kiselina ..... 6

1.6. Koneksini ..... 8

**2. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 11**

**3. MATERIJAL I METODE ..... 13**

3.1. Eksperimentalne životinje ..... 14

3.2. Štakorski model šećerne bolesti ..... 14

3.3. Priprema tkiva za imunofluorescenciju ..... 14

3.3.1. Trikromno bojanje po Mallory-ju ..... 15

3.3.2. Imunofluorescencijska bojanja ..... 15

3.4. Analiza mikrofotografija i kvantifikacija ..... 15

3.5. Statistička analiza podataka ..... 16

**4. REZULTATI ..... 17**

4.1. Razine glukoze u krvi i tjelesne mase štakora na kraju dvadesetog tjedna istraživanja ..... 18

4.2. Morfološke promjene u bubrezima štakora izazvane kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom ..... 19

4.3. Promjene izražaja koneksina 45 u bubrezima štakora izazvane kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom ..... 20

**5. RASPRAVA ..... 22**

**6. ZAKLJUČAK ..... 28**

**7. POPIS LITERATURE ..... 30**

**8. SAŽETAK ..... 37**

**9. SUMMARY ..... 40**

**10. ŽIVOTOPIS ..... 43**

*Veliku zahvalu, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataliji Filipović koja mi je izuzetnim strpljenjem i nesebičnom pomoći u svakom trenutku, omogućila izradu ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste imali vremena za sva moja pitanja i hvala na ugodnoj atmosferi koju ste mi priuštili sve ovo vrijeme.*

*Hvala i prof. dr. sc. Katarini Vukojević, dr. med. koja mi je svojim savjetima pomagala u izradi ovog diplomskog rada. Hvala Vam na svim pozitivnim mislima koje ste mi uputili.*

*Hvala izv. prof. dr. sc. Tomislavu Mašeku koji je svojim projektom Nutritivna modulacija metabolizma dokozaheksaenske kiseline kod dijabetičke dislipidemije (HRZZ 8992) dijelomično financirao ovo istraživanje, i bez čijih podataka ovo istraživanje uopće ne bi bilo izvedivo.*

*Zahvaljujem se puno svim mojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene, i bez kojih cijeli ovaj tijek studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.*

*Posebno hvala mojoj obitelji, na vjeri u moj uspjeh i konstantnoj motivaciji. Hvala vam što ste uvijek uz mene.*

*Veliko HVALA svima!*

# 1. UVOD

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) je metabolička bolest koja je karakterizirana porastom razine glukoze u krvi povezanom s apsolutnim izostankom ili nedovoljnom sekrecijom inzulina iz beta stanica Langerhansovih otočića gušterače (1, 2).

Hiperglikemija je pojam koji se koristi za visoku razinu glukoze u krvi, a nastaje ako organizam ima premalo inzulina ili ako se taj inzulin ne može pravilno iskoristiti (3).

Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO; engl. *World health organization*, WHO), broj osoba oboljelih od šećerne bolesti drastično se povećava u cijelom svijetu. Naime, 1980. godine 4,7% svjetske populacije imalo je šećernu bolest, dok je 2014. godine taj postotak obuhvaćao 8,5% svjetskog stanovništva. Veličinu tog javno-zdravstvenog problema vidimo iz podataka za 2012. godinu kada je od posljedica šećerne bolesti preminulo 1,5 milijun ljudi. Povećavajući rizik od kardiovaskularnih i ostalih bolesti šećerna bolest je bila u podlozi još dodatnih 2,2 milijuna smrtnih slučajeva (4, 5).

Danas, prema procjenama Međunarodne dijabetološke federacije (engl. *International Diabetes Federation*, IDF), u svijetu 415 milijuna odraslih osoba boluje od šećerne bolesti, odnosno svaka jedanaesta osoba, uz pretpostavku da će do 2040. godine taj broj narasti na 642 milijuna (6).

Iako pojedine osobe nemaju nikakve simptome koji bi ukazivali na šećernu bolest, neki od najčešćih simptoma su učestalo mokrenje (poliurija), pojačana žeđ (polidipsija), povećani apetit (polifagija), gubitak tjelesne težine i umor (7).

Ciljne vrijednosti koje se nastoje postići u regulaciji kronične hiperglikemije prema smjernicama iz 2016. su:

- Snižavanje vrijednosti glikoliziranog hemoglobina (HbA1c) ispod ili oko 7%.
- Postizanje značajnije sniženih vrijednosti HbA1c od 6% do 6,5% u osoba mlađe životne dobi, kraćeg trajanja šećerne bolesti, dužeg očekivanog životnog vijeka i bez prisutnih znatnih kardiovaskularnih bolesti.
- U osoba starije životne dobi, onih sa šećernom bolesti sklonih hipoglikemijama, s razvijenim mikrovaskularnim ili makrovaskularnim komplikacijama, odnosno prisutnim komorbiditetima, čija bolest traje duže vrijeme, preporučuje se težiti umjerenijim ciljnim vrijednostima glikoliziranog hemoglobina od 7,5 do 8,0%.
- Održavanje prosječne koncentracije glukoze u plazmi u vrijednostima od 8,3 do 8,9 mmol/L.

- Ciljna koncentracija glukoze u plazmi natašte i preprandijalno treba biti od 3,9 do 7,2 mmol/L, a postprandijalno do 7,8 mmol/L (8).

Ovisno o etiologiji bolesti i prikladnoj terapiji šećerna bolest se klasificira u četiri kategorije:

- *diabetes mellitus* tip 1 ili šećerna bolest tip 1 – ovisan o inzulinu,
- *diabetes mellitus* tip 2 ili šećerna bolest tip 2 – neovisan o inzulinu,
- *diabetes mellitus* tip 3 ili šećerna bolest tip 3 – odnosi se na druge specifične uzroke kao što su pankreatitis, bolesti koje nisu povezane s gušteračom, terapija lijekovima...
- *diabetes mellitus* tip 4 ili šećerna bolest tip 4 – gestacijski dijabetes, odnosno bilo koje odstupanje od normalne vrijednosti glukoze koja se prvi put pojavljuje u trudnoći (1, 9-11).

## 1.1. Šećerna bolest tip 1

Osnovna značajka šećerne bolesti tip 1 (engl. diabetes mellitus type 1, DM1; insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) je selektivno uništenje beta-stanica gušterače, te teški ili apsolutni nedostatak inzulina kojeg luče iste beta-stanice (1).

Dijeli se na imunosnu, koja je ujedno i najčešći oblik šećerne bolesti tip 1, i idiopatsku šećernu bolest. Iako je većina osoba kojima se dijagnosticira šećerna bolest tip 1 mlađa od 30 godina, početak šećerne bolesti može se dogoditi u bilo kojoj životnoj dobi (1). Genetske predispozicije imaju značajan utjecaj na autoimuno uništavanje beta-stanica gušterače. Iz tog razloga su osobe sa tipom 1 često sklone i drugim autoimunim bolestima kao što su percinozna anemija, celijakija, Addisonova bolest, vitiligo, Gravesova bolest i miastenija gravis (11).

Naziva se još i "dijabetes ovisan o inzulinu" iz razloga što je nadomjesno liječenje inzulinom nužno za život (12). Djeca sa šećernom bolesti tip 1 često imaju simptome poliurije, polidipsije, te otprilike jedna trećina razvije dijabetičku ketoacidozu (11). Dijabetička ketoacidoza je po život opasno stanje uzrokovano nedostatkom ili odsutnošću inzulina, a nastaje kao posljedica prekomjerne razgradnje masnih kiselina i stvaranja toksične razine ketokiselina (1, 13).

## 1.2. Šećerna bolest tip 2

Broj osoba koje boluju od šećerne bolesti tip 2 (engl. diabetes mellitus type 2; DM2; non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) se globalno povećava (5). Prema kohortnoj studiji provedenoj u Japanu opaženo je da smanjeno lučenje inzulina ima veći utjecaj na nastanak šećerne bolesti tip 2 nego povećana rezistencija na inzulin, te da u 90% slučajeva osobe koje boluju od šećerne bolesti tip 2 proizvode inzulin, ali ga ne mogu pravilno iskoristiti (13, 14). Uočeno je da učestalost incidencije korelira sa povećanom tjelesnom težinom i nedostatkom fizičke aktivnosti pojedinca, te da je sve češća pojava u osoba mlađe životne dobi (4, 14).

Šećerna bolest tip 2 povezana je s rezistencijom tkiva na inzulin i relativnim nedostatkom sekrecije inzulina. Unatoč relativno očuvanim beta stanicama, lučenje inzulina je nedostatno za potrebe organizma, pa koncentracija glukoze u krvi raste. Osim toga smanjeno je djelovanje inzulina i na metabolizam masti pa se smanjuje razina lipoproteina visoke gustoće (engl. high-density lipoproteins, HDL), a povećava razina slobodnih masnih kiselina i triglicerida. Najčešće u osoba sa dijabetesom tip dva nije potreban inzulin već se kontrola razine glukoze u krvi uspješno provodi oralnom terapijom antidijabeticima.

Pojedine osobe kojima je dijagnosticiran tip 2 mogu imati sporo razvijajući tip 1 ili latentni autoimuni dijabetes odraslih (LADA), pa je u tih osoba nakon nekog vremena nužno uvođenje inzulina. Dijabetička ketoacidoza u šećernoj bolesti tip 2 rijetko se javlja, najčešće kao posljedica nekih lijekova, primjerice kortikosteroida ili nekih infekcija.

Iako je karakteristična za osobe koje boluju od šećerne bolesti tip 2, sve osobe koje pate od šećerne bolesti moraju voditi računa o pravilnoj hidrataciji. U takvih osoba može se dogoditi po život opasna hiperosmolarna koma, u kojoj razine glukoze u krvi narastu 6 do 20 puta iznad normalne razine (1).

## 1.3. Komplikacije

Osobe koje boluju od kronične hiperglikemije imaju povećan rizik od nastanka brojnih zdravstvenih problema. Kronično visoka razina glukoze u krvi može uzrokovati

mikrovaskularne (retinopatija, nefropatija, neuropatija) i makrovaskularne komplikacije (koronarna arterijska bolest, periferna arterijska bolest, te cerebrovaskularne komplikacije) (15).

Stoga kako bi se odgodile ili prevenirale moguće komplikacije od šećerne bolesti nužno je kontrolirati razinu glukoze u krvi, tlak i kolesterol.

*Kardiovaskularne bolesti* su jedne od najčešćih uzroka smrtnosti u osoba koje boluju od šećerne bolesti. Visoki tlak, kolesterol i glukoza u krvi pridonose oštećenju srca i krvnih žila, te mogu uzrokovati moždani udar i koronarnu arterijsku bolest, koja može dovesti do srčanog udara.

*Dijabetička nefropatija* nastaje kao posljedica oštećenja malih krvnih žila u bubregu, što dovodi do slabije perfuzije bubrega krvlju i posljedičnog zatajenja bubrega.

*Dijabetička neuropatija* je oštećenje živaca po cijelom tijelu uzrokovano visokim tlakom i visokom razinom glukoze u krvi. Spomenuto oštećenje može dovesti do problema s probavom, erektilnom disfunkcijom, a najčešće pogađa ekstremitete, posebice stopala. Manifestira se boli, nelagodom i naposljetku gubitkom osjeta, što može dovesti do teških infekcija i/ili amputacija.

*Dijabetička retinopatija* je česta mikrovaskularna komplikacija šećerne bolesti. Najčešće se dijagnosticira u roku 5 godina od dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 i 2. Stoga se osobama koje boluju od šećerne bolesti preporuča učestala kontrola vida (16, 17).

## 1.4. Posljedice hiperglikemije u bubrezima

Bubrezi su zaduženi za održavanje homeostaze glukoze u organizmu u fiziološkim i patološkim stanjima. Procesom glukoneogeneze otpuštaju glukozu u cirkulaciju, a također su odgovorni za filtraciju, reapsorpciju i sekreciju glukoze. Iz tog razloga su promjene u funkciji bubrega uključene u razvoj hiperglikemije i dijabetesa tip 2. Bubrežna reapsorpcija glukoze povećava se sa porastom razine glukoze u plazmi. Stoga u osoba sa šećernom bolesti tip 2 bubrežna reapsorpcija pridonosi razvoju hiperglikemije, koja povećava rizik od nastanka mikrovaskularnih komplikacija (18). Hiperglikemija uzrokuje oštećenje bubrega direktno i posredno preko hemodinamskih modifikacija. Ona povećava aktivnost protein kinaze C, te

glikozilaciju i razinu njenih produkata. Odgovorna je i za glomerularnu hiperfiltraciju i mikroalbuminuriju, koje posredno djeluju na povećanje izražaja transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. transforming growth factor-beta; TGF-beta) (19, 20).

Bubrezi, uz jetru, imaju veliku ulogu u uklanjanju inzulina iz sistemske cirkulacije. 60% bubrežnog klirensa inzulina odvija se glomerularnom filtracijom, dok se ostalih 40% odvija ekskrecijom iz peritubularnih kapilara. Kao posljedica bubrežnog klirensa manje od 1% filtriranog inzulina se pojavljuje u urinu (21).

U normalnim fiziološkim uvjetima klirens inzulina je izuzetno velik i zasićenja se ne događaju. Međutim već u ranoj fazi bubrežnog oštećenja, klirens inzulina se smanjuje. Uslijed hiperfiltracije, uzrokovane hiperglikemijom, glomeruli se oštećuju i propuštaju proteine u urin, od kojih više od 50% čine albumini, i inzulin (18, 21). Krajnji stadij napredovanja bubrežnog zatajenja je smanjenje glomerularne filtracije (glomerular filtration rate; GFR) na manje od 20 ml/min (21).

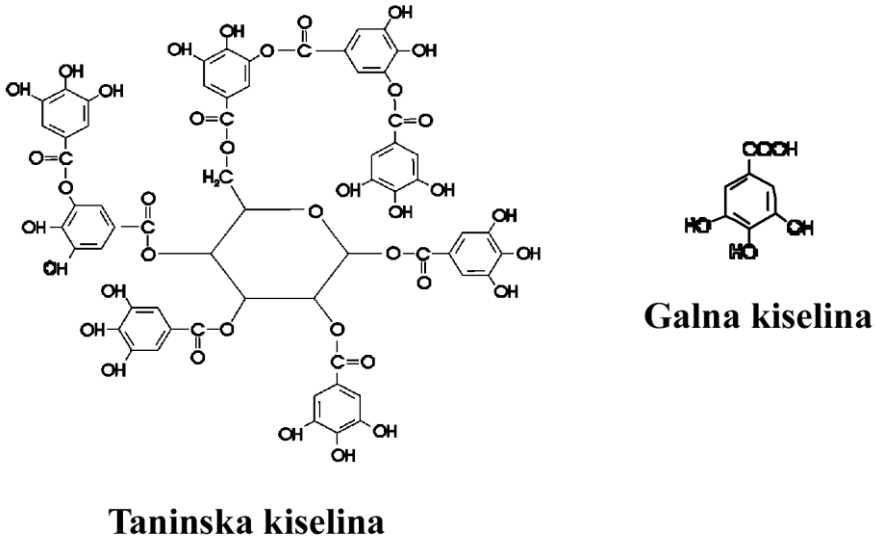
Dijabetička nefropatija se unatoč genetskoj predispoziciji ne javlja bez hiperglikemije (19). Najraniji klinički dokaz nefropatije je mikroalbuminurija ili pojava male razine albumina u urinu (≥30 mg/dan ili 20 μg/min). Iako proces napredovanja albuminurije nije jednak za svaku osobu, povećana je šansa za postupno smanjenje glomerularne filtracije, povišenje krvnog tlaka i povećani rizik od kardiovaskularnih morbiditeta i mortaliteta.

Kako nedijagnosticirana šećerna bolest tip 2 može biti prisutna godinama prije dijagnoze mnogim osobama nedugo poslije se dijagnosticira i mikroalbuminurija, te potom nefropatija. Bez prikladnog liječenja 20% do 40% osoba koje imaju mikroalbuminuriju dobiju nefropatiju, odnosno u 20 godina od dijagnoze 20% osoba dobije bubrežno zatajenje (18).

## 1.5. Taninska kiselina

Taninska kiselina (TK) je hidrofilan polifenolni spoj koji potvrde o svom, po zdravlje pozitivnom djelovanju vuče još iz tradicionalne kineske medicine (22). Osnovne komponente taninske kiseline su galotanini, podskupina tanina koja sadrži glukozu povezanu s galoil esterima (vidi sliku 1) (23). Nalazi se u širokom spektru namirnica kao što su crveno vino,

žitarice,voće, mahunarke, zeleni čaj i ljekovito bilje (22). Hrana bogata taninima smatra se hranom niske nutritivne vrijednosti iz razloga što se teško resorbira iz probavnog trakta.




**Slika 1. Kemijska struktura taninske kiseline.**

Izvor: Labieniec M, Gabryelak T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. Mutat Res. 2003;539(1-2):127-35.

Taninska kiselina štiti stanice od oksidativnog stresa. Svoje snažno antioksidativno djelovanje iskazuje inhibicijom lipidne peroksidacije i nastanka superoksidnih radikala. Zahvaljujući tom svojstvu brojne taninske komponente posjeduju i antikancerogeno djelovanje, te smanjuju broj i aktivnost mutagena (24-28). Antimikrobno djelovanje tanina je dobro poznato. Naime mjerenjem minimalne inhibitorne koncentracije (engl. the minimum inhibitory concentration method; MIC) dokazano je antibakterijsko djelovanje, uz naglasak na snažnije djelovanje na gram negativne bakterije (29). Tanini inhibiraju rast gljivica i virusa. U voću djeluju kao prirodna obrana od mikrobnih infekcija. Stoga se koriste i u procesu prerade i konzerviranja hrane, i to u dozi manjoj od 100 ppm (25, 30).

Taninska kiselina smanjuje postprandijalno povećanje razine glukoze u krvi (31). Stimulira transport glukoze u stanicu, a svoje antidijabetičko djelovanje iskazuje i inhibicijom diferencijacije adipocita. To svojstvo taninske kiseline može povoljno djelovati u osoba s povećanom tjelesnom težinom, osobito u onih osoba u kojih prevladava visceralni tip masnog tkiva, koje boluju od šećerne bolesti tipa 2 (24). Taninska kiselina individualno djeluje na

pojedine organe. Primjerice, dokazano je da iako smanjuje oksidativni stres i posljedičnu hiperglikemiju, ne poboljšava patološku sliku masnih stanica u testisima (32). Pritom treba naglasiti da prilikom interpretacije rezultata različitih istraživanja je potrebno uzeti u obzir i dozu u kojoj se taninska kiselina koristi (25).

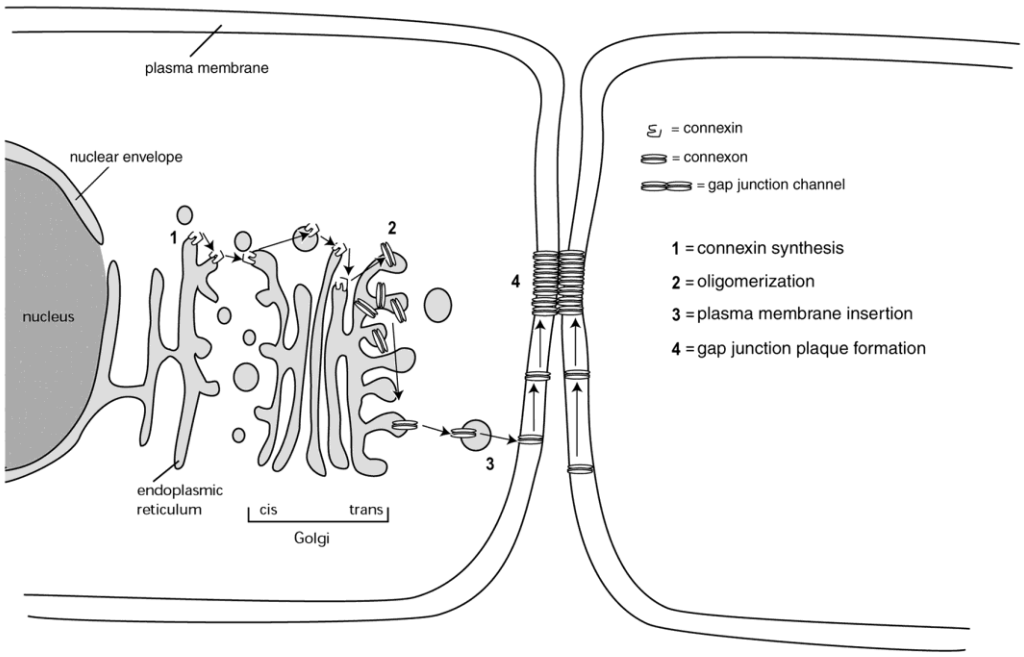
Nasuprot navedenome, postoje i istraživanja koja naglašavaju negativne učinke taninske kiseline, odnosno njezino prooksidativno djelovanje. To prooksidativno djelovanje taninska kiselina ostvaruje u prisutnosti bakrovih iona ($Cu^{2+}$) (33, 34). Također postoje i dokazi o citotoksičnom djelovanju taninske kiseline. Prema istome, taninska kiselina uzrokuje oštećenje DNA određenog tipa stanica (stanične linije B14 hrčka) neovisno o koncentraciji (35), te se smatra da u visokoj koncentraciji svi polifenolni spojevi, u koje se ubraja i taninska kiselina, mogu ostvariti svoj citotoksični učinak (36).

## 1.6. Koneksini

Koneksini (Cx) su transmembranski proteini koji tvore propusne veze (engl. gap junctions) i koneksone koji su značajni za razmjenu iona i malih molekula (manjih od 1,2 kD), kao što su ioni natrija ($Na^{+}$) i kalcija ($Ca^{2+}$), cAMP i inozitol-1,4,5,-trifosfat, između susjednih stanica mnogih tkiva u organizmu kralježnjaka i beskralježnjaka. Koneksoni se još nazivaju i hemikanalima ako su usmjereni na citoplazmu, odnosno ako komuniciraju sa ekstracelularnom tekućinom (37-39). Sinteza koneksina se zbiva na endoplazmatskom retikulumu. Potom se ti isti, novosintetizirani koneksini, u trans-Golgijevom aparatu spajaju u koneksone (40). Koneksoni su tvorbe od 6 koneksinskih molekula povezanih u oblik cilindara (41, 42). Pomoću transportnih vezikula se prenose do stanične membrane, gdje se uklapaju. Potom se lateralnom difuzijom pomiču, stapaju i tako formiraju propusnu vezu između dvije stanice (40) (vidi sliku 2).

Koneksoni su odgovorni za oksidativni stres te razna metabolička i fiziološka stanja (41, 42). Primarna uloga im je dostava ATP-a, glutamata, NAD+ i prostaglandina E2 drugim stanicama, koji tamo ostvaruju svoje parakrino djelovanje (40, 41). Veliku ulogu u prijenosu i vodljivosti propusne veze imaju ioni kalcija ($Ca^{2+}$), koji, promjenom koncentracije u citoplazmi, u normalnim fiziološkim i patološkim stanjima, uzrokuju otvaranje koneksona. Samim time koneksoni reguliraju citoplazmatsku koncentraciju $Ca^{2+}$ i njegovu homeostazu

(41, 43). Iz razloga što su izloženi stalnim promjenama napona, fosforilaciji i oksidativnom stresu koneksine odlikuje kratak poluvijek života, a defekti u koneksinima izravno su povezani sa patološkim procesima koji mijenjaju regulaciju i izražaj u koneksinima, u ljudi i eksperimentalnih životinja (44-46).




**Slika 2. Shematski prikaz nastajanja propusne veze.** 1. Sinteza koneksina na endoplazmatskom retikulumu. 2. Oligomerizacija i nastanak koneksona u trans-Golgijevom aparatu. 3. Koneksoni transportnim vezikulom dolaze do stanične membrane gdje se ugrađuju. 4. Lateralnom difuzijom se koneksoni pomiču i formiraju propusnu vezu. Izvor: Ebihara L. New roles for connexons. News Physiol Sci. 2003;18:100-3.

Danas je poznato oko 20 izoformi koneksina, koji ime dobivaju prema molekulskoj masi. Primjerice koneksin 45 ima molekulsku masu od 45 kDa. Uočeno je da postoji određena homologija između koneksina u čovjeka, miša i štakora (46). Prethodnim studijama je dokazano da su u bubregu izraženi Cx26, Cx30,3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Cx46. Izoforme Cx37, Cx40 i Cx43 su izražene u bubrežnom vaskulatornom sustavu u preglomerularnim arteriolama, dominantno između endotelnih stanica (47, 48). Cx45 su izraženi u bubrežnim arteriolama gdje imaju ulogu vazokonstriktora i vazodilatatora, odnosno regulatora krvnog tlaka i otpuštanja renina (49). Osim toga Cx45 su pronađeni i u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama aferentnih i eferentnih arteriola, te u mezangijalnim stanicama i

podocitima glomerula. Uloga Cx45 u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama je od iznimnog značaja, naime genetskim izbacivanjem Cx45 nastaju letalne mutacije (46).

Propusne veze su pronađene u cijelom jukstaglomerularnom aparatu izuzevši u stanicama macula-e densa-e. Morfološki je dokazano postojanje propusnih veza u proksimalnim zavijenim kanalićima štakora i ljudi, iako je njihova fiziološka uloga malo poznata. Tu nalazimo brojne izoforme koneksina, a između njih su i Cx45, čijim se izražajem bavi i ovo istraživanje. U distalnim zavijenim kanalićima, međutim, postoje neke dvojbe o postojanju Cx45. Naime postoji istraživanje koje je pronašlo, a također i ono koja nije uspjelo zabilježiti izražaj istog koneksina (46, 50, 51). Našim preliminarnim istraživanjem utvrdili smo opsežni izražaj Cx45 u stanicama proksimalnih zavijenih kanalića. Vezano uz to, željeli smo istražiti da li se izražaj Cx45 u proksimalnim zavijenim kanalićima mijenja kao posljedica hiperglikemije, te kako na isti utječe dodatak taninske kiseline.

Propusne veze se vežu uz mnogobrojne fiziološke procese u stanici. Genetskim istaživanjem se se došlo do novih saznanja da s mutacijama gena koneksina dolazi do raznih bolesti, uključujući kataraktu, kožne bolesti, gluhoću i demijelinizacijske neuropatije (52). Iz tog razloga svaka postojeća kronična bolest može dovesti do promjene u funkciji propusnih veza i tako doprinijeti patofiziologiji same bolesti (46). Tako kronična hiperglikemija mijenja broj propusnih veza i time uzrokuje oštećenje krvnih žila i živaca, aterosklerozu, te usporava cijeljenje rana, a svi ti patološki procesi mogu pridonijeti nastanku komplikacija šećerne bolesti (53, 54).

Unatoč tome što se za postojanje koneksina zna desetljećima, postoje brojna područja koja su ostala neistražena, i za koje je potrebno saznati njihovu funkciju (46).

# 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Brojna istraživanja dokazuju povoljan učinak taninske kiseline na ljudski i životinjski organizam. Međutim rijetka otkriju neka nepoželjna djelovanja iste kiseline. Stoga kako bi se što bolje mogli kritički osloniti na povoljna djelovanja i uporabu taninske kiseline u liječenju mnogobrojnih bolesti odlučili smo provesti ovo istraživanje. Cilj ovog diplomskog rada je dokazati potencijalni negativan učinak taninske kiseline na izražaj koneksina 45 u bubregu štakora oštećenom kroničnom hiperglikemijom.

# 3. MATERIJAL I METODE

## 3.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je odobreno od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprave za veterinarstvo i nacionalnog Etičkog povjerenstva (broj odobrenja EP 13/2015). Dijelom je financirano iz sredstava projekta Nutritivna modulacija metabolizma dokozaheksaenske kiseline kod dijabetičke dislipidemije (HRZZ 8992). Istraživanje je provedeno na dvanaest muških štakora soja Wistar. Štakori su za vrijeme istraživanja, koje je trajalo dvadeset tjedana, bili smješteni u polikarbonatne kaveze, u kontroliranim uvjetima pri temperaturi 22 ± 1ºC i izmjenama ciklusa svijetla/tame svakih 12 sati. Svi štakori na početku istraživanja bili su približno jednake težine (220 ± 10g).

## 3.2. Štakorski model šećerne bolesti

Nakon dva tjedna aklimatizacije štakori su podijeljeni u tri skupine po četiri štakora. Skupine su formirane na osnovu napitaka koje su štakori konzumirali. Prva skupina koja je konzumirala čistu vodu za piće je uzeta kao kontrolna skupina. Druga skupina je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze, dok je treća skupina konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze, uz dodatak 0,1% taninske kiseline. Korištena doza je najčešće korištena prema literaturi te je za pola manja od toksične doze, a u pokusima pokazuje očekivane povoljne učinke (55). Sve otopine su svakodnevno svježe pripravljane. Hrana koju su štakori konzumirali *ad libitum*, sadržavala je 18% bjelančevina i 5% masti. Štakori su vagani svakog tjedna u 8:00 sati ujutro, te im je mjerena razina glukoze u krvi pomoću Accu-Chek Go aparata u isto vrijeme (56).

## 3.3. Priprema tkiva za imunofluorescenciju

Nakon 20 tjedana štakori su eutanizirani, njihovi bubrezi su uklonjeni, zamrznuti tekućim dušikom i pohranjeni na -80ºC do analize. Tkiva su nakon ispiranja u fosfatnom puferu (PBS) dehidrirana u nizu otopina etanola rastućih koncentracija i potom uklopljena u parafin. Izrezana su na debljinu od 5 μm i zatim postavljena na predmetna stakalca. Nakon

obavljene deparafinizacije, pristupilo se standardnom histološkom ili imunohistokemijskom bojanju.

### 3.3.1. Trikromno bojanje po Mallory-ju

Hematoksilinom smo inkubirali uzorke kroz pet minuta. Zatim smo ih isprali u vodi iz slavine, te inkubirali u kiselom fuksinu. Kiseli fuksin smo ispirali nekoliko puta u destiliranoj vodi, a potom smo rezove tkiva diferencirali u 1% fosfomolibdenskoj kiselini kroz jednu minutu. Nakon diferenciranja uzorke smo isprali u destiliranoj vodi te ih stavili na inkubiranje 15 minuta u anilinsko modrilo. Slijedilo je ponovno ispiranje u destiliranoj vodi i diferencijacija tkiva u octenoj kiselini između 1 i 5 minuta. Diferencirana tkiva smo dehidrirali u etanolu i ksilolu.

### 3.3.2. Imunofluorescencijska bojanja

Bojanje je izvršeno uporabom primarnog protutijela kunića, koje je protutijelo protiv koneksina 45 (Anti-Connexin 45 / GJA7 antibody - C-terminal; ab135474; Abcam, Cambridge, Velika Britanija), pri razrjeđenju 1:100. Uzorke smo inkubirali preko noći. Potom smo ih isprali u PBS-u, te inkubirali tijekom 1,5h u sekundarnom protutijelu. Sekundarno protutijelo je magareće protutijelo protiv imunoglobulina kunića konjugirano s rodaminom (Rhodamine Red TM-conjugated donkey anti rabbit; 711-295-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD) pri razrjeđenju 1:300.

Nakon ispiranja u PBS-u, stakalca su ostavljena na zraku da se osuše i pokrivena medijem protiv izbljeđivanja (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Kontrolno bojanje je uključivalo izostanak primarnih protutijela u postupku bojanja tkiva.

## 3.4. Analiza mikrofotografija i kvantifikacija

Mikroskopiranje i fotografiranje je obavljeno mikroskopom (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) s hlađenom digitalnom kamerom (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) pod povećanjem od

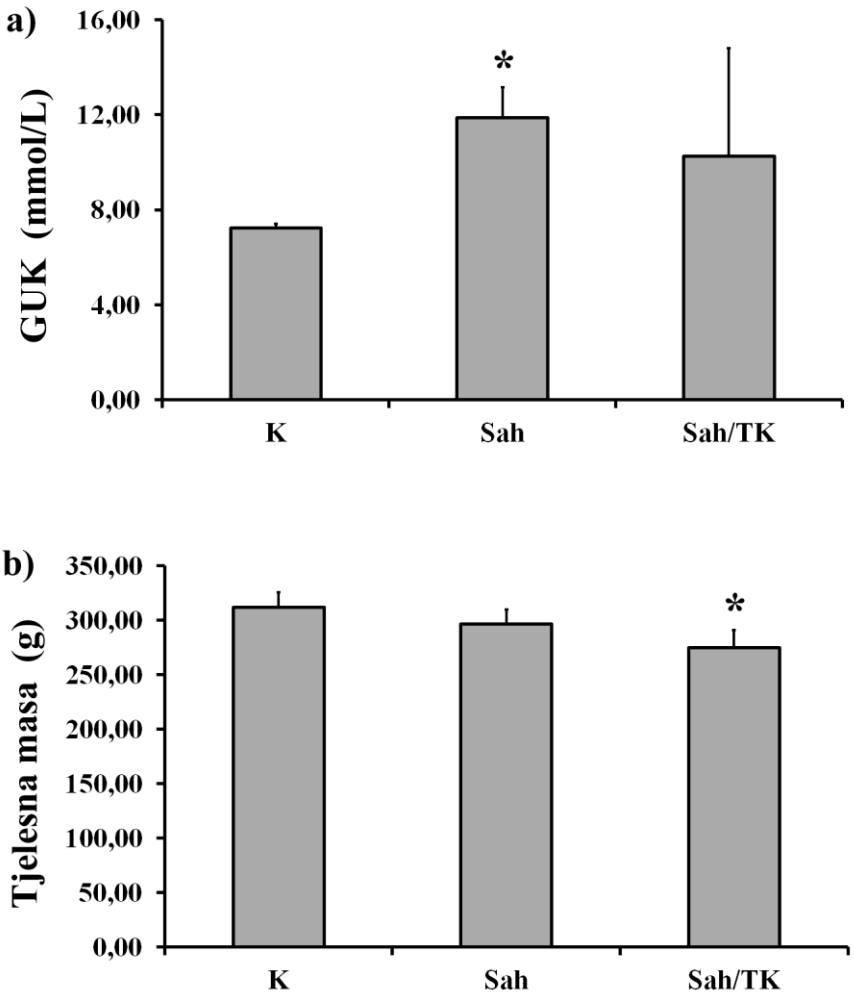
40x. Fotografirane su površine proksimalnih zavijenih kanalića bubrega u kojima je uočena imunoreaktivnost. Mikrofotografije su potom analizirane koristeći se programom Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Analizirali smo negativne fotografije na kojima su bijele površine označavale imunoreaktivnost koneksina 45. Analizu smo započeli kalibracijom svih slika kako bi ih uskladili s računalnim programom. Potom smo radi ujednačenosti podataka na svaku sliku ugradili mrežu (eng. grid). Kao mjernu jedinicu površine obuhvaćene mrežom postavili smo 2000μm². Svaku pojedinačnu površinu mreže koja je obuhvaćena imunofluorescencijom koneksina 45 smo označili i analizirali, te preračunali u postotak površine prekrivene imunofluorescencijom.

### 3.5. Statistička analiza podataka

Program GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, SAD) upotrijebili smo za statističku analizu. Koristili smo Kruskal-Wallisov test, uz Dunnov test za utvrđivanje značajne razlike među pojedinačnim skupinama. Kao statistički značajnu razliku postavili smo $p < 0,05$.

# 4. REZULTATI

## 4.1. Razine glukoze u krvi i tjelesne mase štakora na kraju dvadesetog tjedna istraživanja

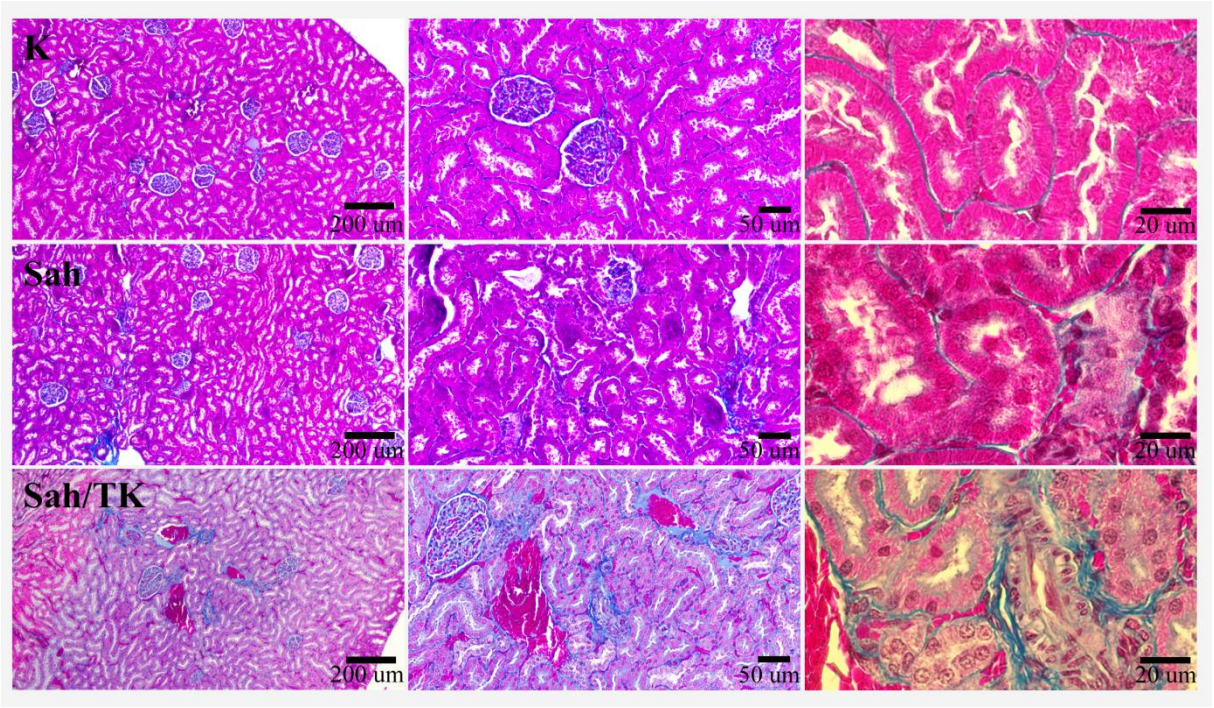



**Slika 3. Grafički prikaz razina glukoze u krvi (a) i tjelesnih masa (b) štakora u svim pokusnim i kontrolnim skupinama nakon dvadeset tjedna tretmana taninskom kiselinom i vodenom otopinom saharoze.** GUK – razina glukoze u krvi; K – kontrolna skupina; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze umjesto vode za piće; Sah/TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze uz dodatak 0,1% taninske kiseline umjesto vode za piće. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu $p<0,05$.

Prema dobivenim rezultatima 20-tog tjedna istraživanja uočeno je da je Sah skupina u usporedbi s K skupinom imala statistički značajno veću ($p<0,05$) prosječnu razinu glukoze u

krvi. Međutim razina glukoze u Sah/TK skupini nije se statistički značajno razlikovala ni u usporedbi s K skupinom, ni sa Sah skupinom. Srednja vrijednost tjelesne težine Sah/TK je bila statistički značajno ($p<0,05$) niža u usporedbi s K skupinom (slika 3).

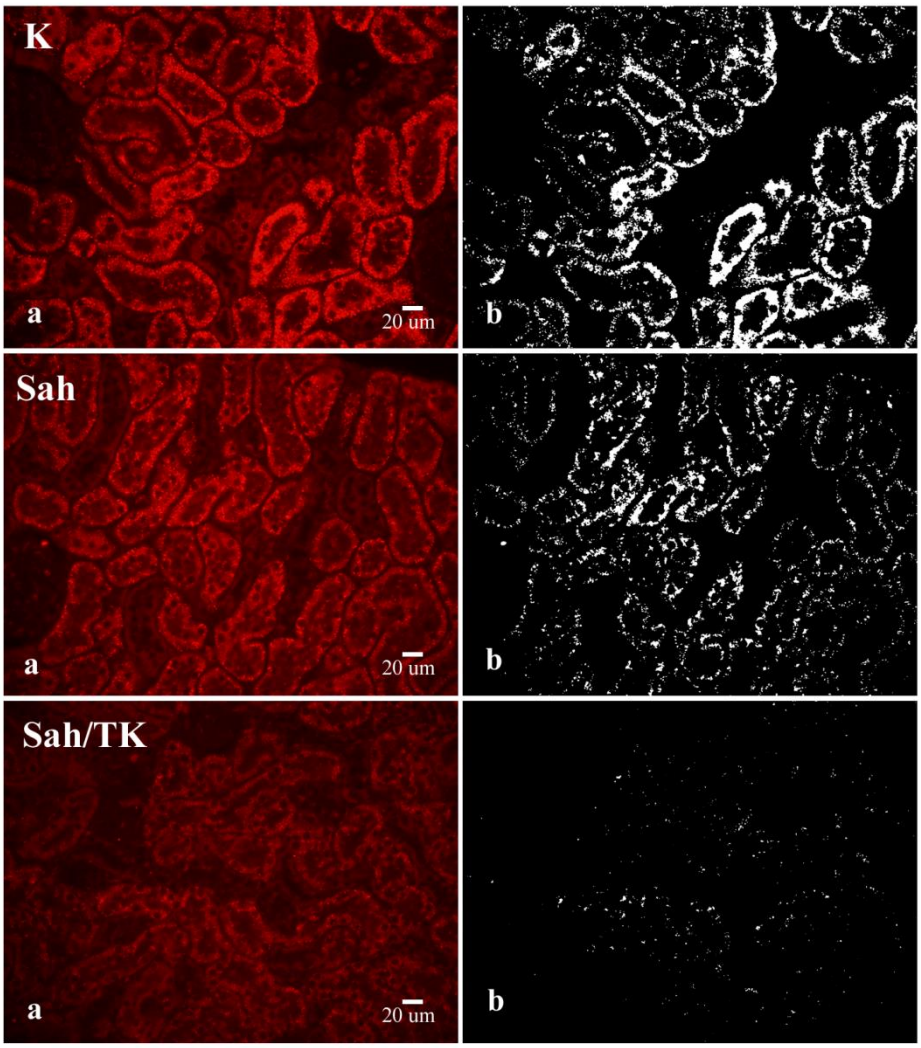
## 4.2. Morfološke promjene u bubrezima štakora izazvane kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom



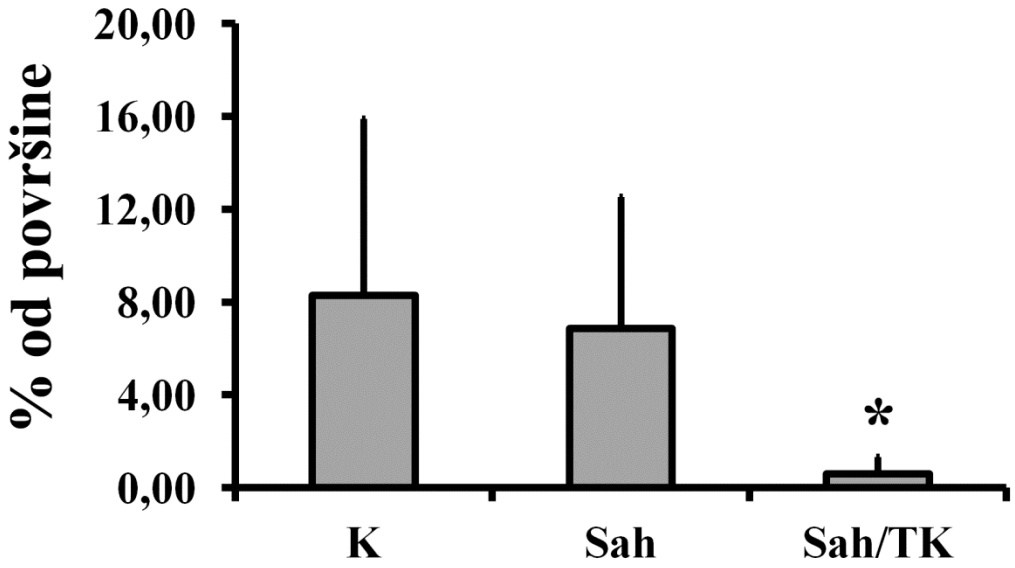

**Slika 4. Reprezentativni prikaz morfoloških promjena u bubrezima štakora izazvanih kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom.** Histološki rezovi bubrega obojani postupkom trikromnog bojanja po Mallory-ju. Povećanja objektiva 4x; 10x i 40x. K – kontrolna skupina; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze umjesto vode za piće; Sah/TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze uz dodatak 0,1% taninske kiseline umjesto vode za piće.

Na histološkim presjecima kroz bubrege pokusnih životinja obojanih po Mallory-ju vide se morfološke promjene na tkivu bubrega u skupinama Sah i Sah/TK, koje ukazuju na uznapredovalo oštećenje. U skupini Sah vidi se veći broj oštećenih proksimalnih zavijenih kanalića u odnosu na K skupinu (Slika 4). Također se primjećuje i oštećenje glomerula. U skupini Sah/TK oštećenje je još jače izraženo, sa vidljivim znakovima skleroze.

### 4.3. Promjene izražaja koneksina 45 u bubrezima štakora izazvane kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom




**Slika 5. Reprezentativni prikaz promjena izražaja koneksina 45 u bubrezima štakora izazvanih kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom.** Histološki rezovi bubrega obojani postupkom imunofluorescencijskog bojanja (a). Povećanje objektiva 40x. K – kontrolna skupina; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze umjesto vode za piće; Sah/TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze uz dodatak 0,1% taninske kiseline umjesto vode za piće. Istovjetne mikrofotografije obrađene programom ImageJ za analizu (b).




**Slika 6. Grafički prikaz promjena izražaja koneksina 45 u bubrezima štakora izazvanih kroničnom hiperglikemijom i taninskom kiselinom.** K – kontrolna skupina; Sah – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze umjesto vode za piće; Sah/TK – skupina štakora koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze uz dodatak 0,1% taninske kiseline umjesto vode za piće. Rezultati su izraženi kroz postotak od ukupne analizirane površine zavijenih kanalića prekrivenih imunofluorescencijom, a prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu $p<0,05$.

Na histološkim rezovima bubrega pokusnih štakora utvrđena je jaka imunoreaktivnost koneksina 45 u stanicama proksimalnih zavijenih kanalića. Imunoreaktivnost za koneksin 45 nije utvrđena u glomerulima, niti u distalnim zavijenim kanalićima. Izražaj koneksina 45 bio je intenzivniji u štakora kontrolne skupine (K; Slika 5). Isti se smanjio u skupini Sah, a najmanji je bio u skupini Sah/TK (Slika 5). Analizom mikrofotografija utvrđena je statistički značajno manja površina proksimalnih zavijenih kanalića prekrivena imunofluorescencijom na koneksin 45 u životinja skupine Sah/TK, u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p<0,05$; Slika 6).

# 5. RASPRAVA

Istražen je utjecaj taninske kiseline na izražaj koneksina 45 u bubregu štakora oštećenom kroničnom hiperglikemijom. Radili smo na modelu štakora, soja Wistar, u kojem smo kroničnu hiperglikemiju izazvali svakodnevnim konzumiranjem 30%-tne vodene otopine saharoze, kroz period od dvadeset tjedana. Statistički značajno povećana razina glukoze u krvi i blago smanjena tjelesna Sah skupine u odnosu na K skupinu potvrđuju model šećerne bolesti tip 2, što je u skladu s klasičnim simptomima pojave šećerne bolesti (7).

Također, uočeno je da u skupini Sah/TK zabilježen blagi pad razine glukoze u krvi i tjelesne mase u odnosu na Sah skupinu, ali i manji porast razine glukoze u krvi i statistički značajan pad tjelesne mase u odnosu na K skupinu što je u skladu s istraživanjem Gin i sur. koje dokazuje da taninska kiselina smanjuje postprandijalno povećanje glukoze u krvi (31). Drugo istraživanje koje je u skladu s našim rezultatima, dokazuje da taninska kiselina stimulira transport glukoze u stanicu i smanjuje tjelesnu težinu štakora inhibicijom diferencijacije adipocita (24).

Patohistološki nalaz bubrega ukazuje da je dugotrajno konzumiranje velikih količina saharoze dovelo do morfoloških promjena koje ukazuju na oštećenje proksimalnih zavijenih kanalića i glomerula (Slika 4). Dodatak taninske kiseline rezultirao je još izrazitijim oštećenjem, sa vidljivim znakovima skleroze, što je bilo jasno izraženo u skupini Sah/TK (Slika 4).

Prema istraživanju Akomolafe i sur. (2014), sedmodnevni pretretman taninskom kiselinom u dozama od 20 i 40 mg/kg tjelesne mase, značajno je poboljšao bubrežnu funkciju štakora podvrgnutih citostatiku cisplatinu, mjereno kroz pad razine kreatinina, ureje i mokraćne kiseline u krvnoj plazmi (57). U istome modelu, utvrđeno je da je pretretman taninskom kiselinom rezultirao očuvanjem antioksidativnog statusa, čime autori djelomično objašnjavaju protektivni učinak taninske kiseline na nefrotoksičnost cisplatina. Međutim, u istome istraživanju, u skupini štakora koja je dobivala samo taninsku kiselinu (40 mg/kg) vidljiv je i veliki pad razine kreatinina u plazmi, ali uz istodobni dvostruki porast aktivnosti superoksid dismutaze, kao jednog od pokazatelja antioksidativnog statusa. Također je utvrđeno da ovaj protektivni učinak taninska kiselina dijelom zahvaljuje kočenju enzima arginaze u bubregu. Isti autori tvrde da je pretretman taninskom kiselinom znatno poboljšao histopatološki nalaz u bubrezima, međutim, iz prikazanih mikrofotografija može se vidjeti znatno oštećenje glomerula i zavijenih kanalića u skupini životinja koje su dobile 40 mg/kg taninske kiseline kao pretretman cisplatinu (57).

U istraživanju Turgut Cosan i sur. (2015) na štakorskom modelu farmakološki uzrokovane hipertenzije, utvrđeno je da taninska kiselina, u dozi od 50 mg/kg, aplicirana intraperitonealno jednom u tri dana tijekom 15 dana, ima povoljan učinak na neke pokazatelje funkcije bubrega (58). Međutim, ovo istraživanje jedno je u nizu koje ukazuje na to da učinak taninske kiseline na stanice ovisi ne samo o dozi, već i o drugim čimbenicima, kao i o tipu stanica. Primjerice, sama taninska kiselina izazvala je u spomenutom istraživanju dramatični pad aktivnosti katalaze u srčanom mišiću, dok je u kombinaciji s utjecajem hipertenzije dodatak taninske kiseline rezultirao značajnim padom aktivnosti istog enzima u hemolizatu, kao i u tkivu bubrega. Isti učinak ovdje nije utvrđen samostalnim djelovanjem taninske kiseline (58). Navedeno je u suglasju s negativnim učincima taninske kiseline koje smo utvrdili našim istraživanjem na tkivu bubrega u kombinaciji s djelovanjem kronične hiperglikemije.

Nadalje, u navedenom istraživanju iz 2015. razina malondialdehida (MDA), kao pokazatelja oksidacijskog stresa, značajno je porasla dodatkom taninske kiseline u kombinaciji s hipertenzijom, sukladno s promjenama aktivnosti katalaze. Nasuprot tome, razina MDA u srcu nije se promijenila samo dodatkom taninske kiseline, ali je dramatično pala u kombinaciji istog s hipertenzijom. U jetri je razina MDA značajno porasla u kontrolnoj skupini dodatkom taninske kiseline, dok je nasuprot tome pala na polovicu od normalne u tkivu bubrega (58).

U našim istraživanjima također smo utvrdili da učinci taninske kiseline ovise o tipu stanica, odnosno organu. Dok je u tkivu jetre štakora s kroničnom hiperglikemijom dodatak taninske kiseline poboljšao patohistološku sliku i umanjio oštećenje (Mašek i sur., neobjavljeni podaci), u tkivu bubrega tijekom našeg istraživanja, dodatak taninske kiseline u istoj dozi znatno je pogoršao patohistološku sliku, što se očitovalo posebice oštećenjem glomerula i proksimalnih zavijenih kanalića. Doza taninske kiseline koju smo koristili prema literaturi je najčešće korištena doza, koja je za pola manja od toksične doze, a u pokusima pokazuje očekivane povoljne učinke (55), slično kako smo utvrdili na tkivu jetre (Mašek i sur., neobjavljeni podaci). Našim istraživanjem željeli smo utvrditi da li takva, očekivano povoljna primjena taninske kiseline može na bubregu imati negativne nuspojave.

Koneksini (Cx) su transmembranski proteini koji tvore propusne veze (engl. gap junctions) i koneksone (hemikanale) koji su značajni za razmjenu iona i malih molekula,

između susjednih stanica mnogih tkiva u organizmu kralježnjaka i beskralježnjaka (37-39). Prethodnim istraživanjima uočeno je da postoji određena homologija između koneksina u čovjeka, miša i štakora te se navedene životinje s osnovom mogu koristiti kao pokusni modeli. U bubregu je izraženo devet izoformi konesksina, a izraženi su Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Cx46 (46). Funkcije u bubregu im još nisu dovoljno istražene.

Od različitih izoformi koneksina, Cx45 pronađen je u bubregu u bubrežnim arteriolama gdje ima ulogu u vazokonstrikciji i vazodilatatciji, odnosno djeluje kao regulator krvnog tlaka i otpuštanja renina (49). Osim u glatkim mišićnim stanicama aferentnih i eferentnih arteriola, Cx45 pronađen je također i u mezangijskim stanicama i podocitima glomerula, te u proksimalmim zavijenim kanalićima (46). O postojanju Cx45 u distalnim zavijenim kanalićima postoje dva istraživanja koje različito navode. Prema istraživanju Butterweck i sur. (1994) izražaj Cx45 je zabilježen u glomerulima i distalnim zavijenim kanalićima(50), dok istraživanje Silverstein i sur. (2003) opovrgava to isto postojanje (51).

Za razliku od dosadašnjih istraživanja, u našem istraživanju na bubregu štakora utvrdili smo jaku imunoreaktivnost Cx45 samo u proksimalnim zavijenim kanalićima. To je u suprotnosti sa istraživanjem Kurtza i sur. (2009) na 3 modela C57 Bl/6 miša, koji su utvrdili prisutnost Cx45 u bubrežnim arteriolama, u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama aferentnih i eferentnih arteriola i u glomerulima (59), te već ranije spomenutom istraživanju iz 1994 (50). Za razliku od navedenih istraživanja, mi nismo utvrdili imunoreaktivnost Cx45 u stanicama glomerula, stanicama distalnih zavijenih kanalića, niti u krvnim žilama bubrega.

Navedene razlike između naših rezultata i literaturnih podataka mogu se objasniti različitošću u specifičnosti korištenih protutijela. Također ne možemo zanemariti niti potencijalne razlike među različitim vrstama i sojevima životinja.

Šećerna bolest mijenja regulaciju Cx i njihov izražaj, a Cx su bitni za normalni razvoj i funkciju brojnih organa (46). Tako kronična hiperglikemija mijenja broj propusnih veza i time uzrokuje oštećenje krvnih žila i živaca, aterosklerozu, te usporava cijeljenje rana, a svi ti patološki procesi mogu pridonijeti nastanku komplikacija šećerne bolesti (53, 54).

Mi smo utvrdili pad imunoreaktivnosti Cx45 u proksimalnim zavijenim kanalićima. Izražaj koneksina 45 bio je intenzivniji u štakora K skupine (Slika 5). Isti se smanjio u skupini Sah, a najmanji je bio u skupini Sah/TK (Slika 5). Analizom mikrofotografija utvrđena je

statistički značajno manja površina proksimalnih zavijenih kanalića prekrivena imunofluorescencijom na koneksin 45 u životinja skupine Sah/TK, u usporedbi s K skupinom ($p<0,05$; Slika 6).

Prema istraživanju Lia i sur. (2016) provedenom na mužjacima štakora soja Wistar u kojih je tijekom četiri tjedna inducirana šećerna bolest tip 2 dokazano je da šećerna bolest tip 2 izaziva produljenje P-vala u elektrokardiogramu. Produljenje P-vala može se objasniti disregulacijom izražaja koneksina pri čemu uslijed šećerne bolesti tip 2 dolazi do smanjenja izražaja Cx40 u lijevom atriju, dok izražaj Cx43 ostaje nepromijenjen (60).

U istraživanju Cigliola i sur. (2016) provedenom na transgeničnim miševima kojima je inducirana šećerna bolest tip 2, sa polimorfizmom gena GJD2 koji kodira koneksin 36, uočen je smanjen izražaj Cx36 u beta stanicama gušterače. Time se može smatrati da polimorizam gena GJD2 doprinosi patogenezi smanjene produkcije inzulina (61). Da smanjen izražaj Cx36 u beta stanicama gušterače miševa koji boluju od šećerne bolesti tip 2 doprinosi patologiji šećerne bolesti, dokazano je i u istraživanju Short i sur. (2014) (62). Istraživanjem Yu i sur. (2016) provedenom na kulturi stanica dokazano je da uslijed hiperglikemije dolazi do smanjenog izražaja Cx43 u epitelnoj barijeri dišnog sustava (63). Prema istraživanju Satriano i sur. (2010) provedenom na muškim štakorima soja Sprague-Dalwey dokazano je da se u proksimalnim zavijenim kanalićima izražaj koneksina 43 smanjuje uslijed šećerne bolesti tipa 2 (64).

Prema istraživanju Veeranki i sur. (2016) koje je trajalo pet tjedana, provedenom na db/db miševima, uočena je povećana razina Cx43 u mitohondrijima u srcu kao posljedica umjerene tjelovježbe (65). Isto je zaključeno i u istraživanju Hesari i sur. (2014) provedenom na 60 Wistar štakora, u kojem je utvrđeno da se razina Cx43 u srcu povećava sa umjerenom tjelovježbom, koja istodobno smanjuje razinu glukoze u krvi (66).

U istraživanjima Durham i sur. (2015), te Tien i sur. (2016) dokazano je da smanjena razina Cx43 u retini ljudskog oka je povezana sa povećanom incidencijom dijabetičke retinopatije (67, 68). Također u istraživanju Tien i sur. (2014) provedenom na štakorima dokazano je da smanjena razina Cx43 u krvnim žilama oka pogoduje razvoju retinopatije u štakora koji boluju od šećerne bolesti (69). Iz istraživanja Manasson i sur. (2013) saznajemo da smanjeni izražaj Cx30.2 u miševa koji boluju od šećerne bolesti također oštećuje krvne žile retine i posljedično pridonosi razvoju retinopatije (70).

Navedena istraživanja su u skladu s našim rezultatima smanjene imunoreaktivnosti koneksina 45 u bubregu oštećenom kroničnom hiperglikemijom. Navedeni pad izražaja Cx45 najvjerojatnije se može objasniti jakim oštećenjem stanica uslijed hiperglikemije, koja oštećenje bubrege izravno i posredno preko hemodinamskih modifikacija (19, 20). S obzirom na to da su koneksini izloženi stalnim promjenama napona, fosforilaciji i oksidativnom stresu, te da ih odlikuje kratak poluvijek života, i velik obrtaj koneksina (44-46), te da se uslijed šećerne bolesti smanjuje izražaj drugih izoformi koneksina (60-69) za očekivati je da će takva oštećenja u stanicama uzrokovati i proremećaj u prometu proteina Cx45 i smanjiti njegov izražaj. S obzirom na zasad još nepoznatu funkciju Cx u zavijenim kanalićima bubrega moguća je pretpostavka da se uslijed izostanka komunikacije između stanica još više naruši njihova funkcija te tako dodatno doprinese razvoju komplikacija hiperglikemije. Iz svega prethodno navedenog proistječe da su u ovome području potrebna još dodatna istraživanja.

# 6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo donijeti sljedeće zaključke:

1. Taninska kiselina u kombinaciji s kroničnom hiperglikemijom u primijenjenoj dozi od 0,1% u vodi za piće oštećuje bubrege.
2. Taninska kiselina u kombinaciji s kroničnom hiperglikemijom rezultira značajnim padom izražaja koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega štakora.
3. Potrebna su dodatna istraživanja u ovom području kako bi se utvrdila funkcionalna uloga koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna klinička farmakologija. 11 ed. Nolte MS, editor. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
2. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2010;33 Suppl 1:S62-9.
3. Hyperglycemia (High Blood Glucose) [Internet]. SAD, American Diabetes Association; 2014 [citirano 2016 Oct 11]. Dostupno na: http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/blood-glucose-control/hyperglycemia.html?referrer=https://www.google.hr/.
4. World Health Day 2016: WHO calls for global action to halt rise in and improve care for people with diabetes [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/world-health-day/en/.
5. Sakai S, Tanimoto K, Imbe A, Inaba Y, Shishikura K, Tanimoto Y, et al. Decreased beta-Cell Function Is Associated with Reduced Skeletal Muscle Mass in Japanese Subjects without Diabetes. PloS one. 2016;11(9):e0162603.
6. IDF diabetes atlas - 7th edition [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.diabetesatlas.org/.
7. Signs and symptoms of diabetes [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.idf.org/signs-and-symptoms-diabetes.
8. Rahelić D, Albatras V, Bakula M, Balić S, Balint I, Bergman Marković B. Hrvatske smjernice za farmakološko liječenje šećerne bolesti tip 2 [Internet]. Hrvatska, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/HR-smjernice-DM2-2016.pdf.
9. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. 1998;15(7):539-53.
10. Metelko Z, Pavlic-Renar I, Tomic M, Bratanic N. [New diagnostic criteria and classification of diabetes mellitus]. Lijecnicki vjesnik. 2000;122(5-6):99-102.
11. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. Diabetes care. 2016;39 Suppl 1:S13-22.
12. World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus [Internet]. Geneva, World Health Organization,

Department of Noncommunicable Disease Surveillance; 1999 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf?ua.

13. Morimoto A, Tatsumi Y, Deura K. Impact of impaired insulin secretion and insulin resistance on the incidence of type 2 diabetes mellitus in a Japanese population: the Saku study. Diabetologia. 2013;56(8):1671–9.

14. Promoting health through the life-course, World Diabetes Day [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.who.int/life-course/news/events/world-diabetes-day-2016/en/.

15. Complications of diabetes [Internet]. Belgium, International Diabetes Federation; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.idf.org/complications-diabetes.

16. 9. Microvascular Complications and Foot Care. Diabetes care. 2016;39 Suppl 1:S72-80.

17. World Health Day 2016: WHO calls for global action to halt rise in and improve care for people with diabetes [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2016 [citirano 2016 Sep 14]. Dostupno na: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/world-health-day/en/.

18. Triplitt CL. Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. Am J Manag Care. 2012;18(1 Suppl):S11-6.

19. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2005;16 Suppl 1:S30-3.

20. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. Exp Biol Med (Maywood). 2008;233(1):4-11.

21. Sampanis C. Management of hyperglycemia in patients with diabetes mellitus and chronic renal failure. Hippokratia. 2008;12(1):22-7.

22. Chu X, Wang H, Jiang Y, Zhang Y, Bao Y, Zhang X, et al. Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro. Journal of Pharmacological Sciences. 2016;130(1):15-23.

23. Klein G, Kim J, Himmeldirk K, Cao Y, Chen X. Antidiabetes and Anti-obesity Activity of Lagerstroemia speciosa. Evid Based Complement Alternat Med. 2007;4(4):401-7.

24. Tikoo K, Tamta A, Ali IY, Gupta J, Gaikwad AB. Tannic acid prevents azidothymidine (AZT) induced hepatotoxicity and genotoxicity along with change in expression of PARG and histone H3 acetylation. Toxicology letters. 2008;177(2):90-6.

25. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. Critical reviews in food science and nutrition. 1998;38(6):421-64.
26. Zhao T, Sun Q, del Rincon SV, Lovato A, Marques M, Witcher M. Gallotannin imposes S phase arrest in breast cancer cells and suppresses the growth of triple-negative tumors in vivo. PloS one. 2014;9(3):e92853.
27. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono Y, Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001;48(4):487-91.
28. Yokozawa T, Oura H, Hattori M, Iwano M, Dohi K, Sakanaka S, et al. Inhibitory effect of tannin in green tea on the proliferation of mesangial cells. Nephron. 1993;65(4):596-600.
29. Kim TY, Cha SH, Cho S, Park Y. Tannic acid-mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles. Arch Pharm Res. 2016;39(4):465-73.
30. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Tannic acid (hydrolyzable gallotannins) [Internet]. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration; 2015 [citirano 2016 Sep 20]. Dostupno na: http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261485.htm.
31. Gin H, Rigalleau V, Caubet O, Masquelier J, Aubertin J. Effects of red wine, tannic acid, or ethanol on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetic patients and on starch digestibility in vitro. Metabolism: clinical and experimental. 1999;48(9):1179-83.
32. Masek T, Starcevic K. Lipogenesis and lipid peroxidation in rat testes after long-term treatment with sucrose and tannic acid in drinking water. Andrologia. 2016.
33. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radic Biol Med. 1997;22(5):749-60.
34. Teixeira S, Siquet C, Alves C, Boal I, Marques MP, Borges F, et al. Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. Free Radic Biol Med. 2005;39(8):1099-108.
35. Labieniec M, Gabryelak T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. Mutat Res. 2003;539(1-2):127-35.
36. Gupta S, Saha B, Giri AK. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. Mutat Res. 2002;512(1):37-65.
37. Meda P. [Role of intercellular communication via gap junctions in insulin secretion]. Ann Endocrinol (Paris). 1996;57(6):481-3.

38. Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. Nature. 1978;272(5653):501-6.
39. Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(8):2708-12.
40. Ebihara L. New roles for connexons. News Physiol Sci. 2003;18:100-3.
41. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. The Biochemical journal. 2006;397(1):1-14.
42. Loewenstein WR, Rose B. The cell-cell channel in the control of growth. Semin Cell Biol. 1992;3(1):59-79.
43. Unwin PN, Ennis PD. Two configurations of a channel-forming membrane protein. Nature. 1984;307(5952):609-13.
44. Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. Current medicinal chemistry. 2003;10(19):2045-58.
45. Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. Circ Res. 2000;86(7):723-8.
46. Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2010;298(5):R1143-55.
47. Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen T, Holstein-Rathlou NH. Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. Histochem Cell Biol. 2001;115(6):479-87.
48. Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, et al. Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. Kidney Int. 2001;60(1):190-201.
49. Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Kruger O, et al. Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2008;295(2):R371-80.
50. Butterweck A, Gergs U, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells. J Membr Biol. 1994;141(3):247-56.

51. Silverstein DM, Thornhill BA, Leung JC, Vehaskari VM, Craver RD, Trachtman HA, et al. Expression of connexins in the normal and obstructed developing kidney. Pediatr Nephrol. 2003;18(3):216-24.
52. White TW, Paul DL. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. Annu Rev Physiol. 1999;61:283-310.
53. Zou XR, Tao J, Wang YK. [Gap junction and diabetic foot]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2015;44(6):684-8.
54. Hamelin R, Allagnat F, Haefliger JA, Meda P. Connexins, diabetes and the metabolic syndrome. Curr Protein Pept Sci. 2009;10(1):18-29.
55. Barszcz M, Taciak M, Skomial J. A dose-response effects of tannic acid and protein on growth performance, caecal fermentation, colon morphology, and beta-glucuronidase activity of rats. Journal of Animal and Feed Sciences. 2011;20:613-25.
56. Hawkins RC. Evaluation of Roche Accu-Chek Go and Medisense Optium blood glucose meters. Clinica Chimica Acta. 2005;353:127-31.
57. Akomolafe SF, Akinyemi AJ, Anadozie SO. Phenolic Acids (Gallic and Tannic Acids) Modulate Antioxidant Status and Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. Int Sch Res Notices. 2014;2014:984709.
58. Turgut Cosan D, Saydam F, Ozbayer C, Doganer F, Soyocak A, Gunes HV, et al. Impact of tannic acid on blood pressure, oxidative stress and urinary parameters in L-NNA-induced hypertensive rats. Cytotechnology. 2015;67(1):97-105.
59. Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Connexin expression in renin-producing cells. J Am Soc Nephrol. 2009;20(3):506-12.
60. Li B, Pan Y, Li X. Type 2 Diabetes Induces Prolonged P-wave Duration without Left Atrial Enlargement. J Korean Med Sci. 2016;31(4):525-34.
61. Cigliola V, Populaire C, Pierri CL, Deutsch S, Haefliger JA, Fadista J, et al. A Variant of GJD2, Encoding for Connexin 36, Alters the Function of Insulin Producing beta-Cells. PloS one. 2016;11(3):e0150880.
62. Short KW, Head WS, Piston DW. Connexin 36 mediates blood cell flow in mouse pancreatic islets. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014;306(3):E324-31.
63. Yu H, Yang J, Zhou X, Xiao Q, Lu Y, Xia L. High glucose induces dysfunction of airway epithelial barrier through down-regulation of connexin 43. Experimental cell research. 2016;342(1):11-9.

64. Satriano J, Mansoury H, Deng A, Sharma K, Vallon V, Blantz RC, et al. Transition of kidney tubule cells to a senescent phenotype in early experimental diabetes. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;299(2):C374-80.
65. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. J Mol Cell Cardiol. 2016;92:163-73.
66. Hesari FS, Khajehnasiri N, Khojasteh SM, Soufi FG, Dastranj A. Attenuation of phosphorylated connexin-43 protein levels in diabetic rat heart by regular moderate exercise. Arch Iran Med. 2014;17(8):569-73.
67. Tien T, Muto T, Zhang J, Sohn EH, Mullins RF, Roy S. Association of reduced Connexin 43 expression with retinal vascular lesions in human diabetic retinopathy. Exp Eye Res. 2016;146:103-6.
68. Durham JT, Dulmovits BM, Cronk SM, Sheets AR, Herman IM. Pericyte chemomechanics and the angiogenic switch: insights into the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy? Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(6):3441-59.
69. Tien T, Muto T, Barrette K, Challyandra L, Roy S. Downregulation of Connexin 43 promotes vascular cell loss and excess permeability associated with the development of vascular lesions in the diabetic retina. Mol Vis. 2014;20:732-41.
70. Manasson J, Tien T, Moore C, Kumar NM, Roy S. High glucose-induced downregulation of connexin 30.2 promotes retinal vascular lesions: implications for diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(3):2361-6.

# 8. SAŽETAK

**Naslov:** Utjecaj taninske kiseline na izražaj koneksina 45 u bubregu štakora oštećenom kroničnom hiperglikemijom.

**Cilj:** Cilj ovog diplomskog rada je dokazati potencijalni negativan učinak taninske kiseline na koneksine 45 u bubregu štakora oštećenom kroničnom hiperglikemijom, kako bi se što bolje mogli kritički osloniti na povoljna djelovanja i uporabu taninske kiseline u liječenju mnogobrojnih bolesti.

**Materijal i metode:** Istraživanje koje je trajalo dvadeset tjedana provedeno je na dvanaest muških štakora soja Wistar. Svi štakori na početku eksperimenta bili su približno jednake težine. Nakon dva tjedna aklimatizacije, pod kontroliranim uvjetima, štakori su podijeljeni u tri skupine po četiri štakora. Skupine su formirane na osnovu napitaka koje su štakori konzumirali. Prva skupina koja je konzumirala čistu vodu za piće je uzeta kao kontrolna skupina. Druga skupina je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze, dok je treća skupina konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze, uz dodatak 0,1% taninske kiseline. Hrana koju su štakori konzumirali *ad libitum*, sadržavala je 18% bjelančevina i 5% masti. Štakori su vagani svakog tjedna, te im je u isto vrijeme mjerena i razina glukoze u krvi. Nakon dvadeset tjedana štakori su eutanizirani. Njihovi su bubrezi uklonjeni, zamrznuti tekućim dušikom i pohranjeni na -80ºC do analize. Nakon obavljene pripreme tkiva za imunofluorescenciju pristupilo se trikromnom bojanju po Mallory-ju. Potom je obavljeno bojanje protutijelima, mikroskopiranje i fotografiranje. Mikrofotografije su zatim analizirane pomoću programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Za statističku analizu koristili smo program GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, SAD).

**Rezultati:** Prema dobivenim rezultatima 20-tog tjedna istraživanja uočeno je da je skupina koja je konzumirala 30%-tnu vodenu otopinu saharoze imala značajan porast glukoze u krvi u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,05$), a porast razine glukoze u krvi je bio manji dodatkom taninske kiseline (0,1% u vodi za piće). Taninska kiselina je imala pozitivan učinak na smanjenje tjelesne mase ($p<0,05$). Histologijom su uočena manja oštećenja na bubrezima uzrokovana hiperglikemijom, dok su oštećenja ječe izražena u skupini koja je primala taninsku kiselinu ($p<0,05$). Analizom mikrofotografija utvrdili smo da hiperglikemija uzrokuje smanjeni izražaj koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega, a dodatkom taninske kiseline to smanjenje postaje statistički značajno ($p<0,05$).

**Zaključak:** Temeljem dobivenih rezultata smo zaključili da taninska kiselina u kombinaciji s kroničnom hiperglikemijom u primjenjenoj dozi od 0,1% taninske kiseline u vodi za piće

oštećuje bubrege, te da taninska kiselina u kombinaciji s kroničnom hiperglikemijom rezultira statistički značajnim padom izražaja koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima štakora. Također zaključujemo da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se saznala fiziološka uloga koneksina 45 u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega.

## 9. SUMMARY

**Diploma Thesis Title:** The influence of the tannic acid on the expression of the connexins 45 in a rat kidney damaged by the chronic hyperglycemia.

**Objectives:** The aim of this thesis is to demonstrate the potential negative effect of the tannic acid on the connexin 45 in a rat kindney damaged by the chronic hyperglycemia, due to a need for critical assessment of the positive effects of the use of tannic acid in the treatment of many diseases.

**Material and Methods:** Twelve male Wistar rats were used in the trial over a period of twenty weeks. At the beginig of the experiment all the rats had approximately the equal weight. After two weeks of acclimation, under controlled conditions, the rats were divided into three groups of four rats. The groups were formed based on beverages, which were consumed by the rats. The first group that consumed clean drinking water was taken as a control group. A second group that consumed 30% aqueous sucrose solution, and the third group consumed 30% aqueous solution of sucrose, supplemented with 0,1% tannic acid. The food that the rats consumed *ad libitum*, contained 18% protein and 5% fat. The rats were weighed weekley, and their blood glucose was measured at the same time. After twenty weeks, the rats were euthanized. Their kidneys were removed, frozen with liquid nitrogen and stored at -80ºC until analysis. After the preparation of tissue we colored the tissue by Mallory's trichrome stain. In addition, we did staining with antibodies, microscopy and photography. Microphotographs then were analyzed by Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). For statistical analysis we used the program GraphPad Prism 5 (McIntosh, CA, USA).

**Results:** At the end of this 20-week experiment it was observed that the group, that had consumed 30% aqueous solution of sucrose, had a significant increase in blood glucose level compared to the control group ($p < 0,05$), and in the group where tannic acid (0,1%) was added in a drinking water blood glucose levels were less increased. Also tannic acid (0,1% of tannic acid in a drinking water) had a positive effect on the weight reduction ($p < 0,05$). Pathohistologically, we observed minor damages of the kidneys caused by the hyperglycemia, while damages were more expressed in the group treated with tannic acid ($p < 0.05$). By the analysis of the microphotographs we found that hyperglycemia caused reduced expression of connexin 45 in the proximal tubules of the kidney, and the addition of the tannic acid made the reduction statistically significant ($p < 0,05$).

**Conclusion:** Based on the results, we concluded that the tannic acid in combination with the chronic hyperglycemia, in the determinated dosage of 0,1% of tannic acid, damages the kidneys. We also concluded that tannic acid in combination with the chronic hyperglycemia significantly lowers the expression of the connexin 45 in the proximal tubules of the rats. Additional researches are needed to find out the physiological role of the connexin 45 in the proximal tubules of the kidney.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Osobni podatci:**

**Ime i prezime:** Mia Šarić
**Datum rođenja:** 23. srpnja 1992.
**Mjesto rođenja:** Split, Republika Hrvatska
**Državljanstvo:** hrvatsko
**Adresa stanovanja:** Matoševa 161, 21210 Solin
**E-mail:** mia.saric@yahoo.com

**Obrazovanje:**

**2011. – 2016.** Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija
**2007. – 2011.** Opća gimnazija "Marko Marulić", Split
**2006. – 2007.** Osnovna škola "Kraljice Jelene", Solin
**1999. – 2006.** Osnovna škola "Vjekoslav Parać", Solin

**Radno iskustvo:**

**3.2016. – 9.2016.** Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna „Solin“

**2011. – 2016.** Studentski poslovi u Studentskom centru Split

**Znanja i vještine:**

**Rad na računalu i programski paketi:** MS Office, Eskulap 2000, Adobe Photoshop, ImageJ, EndNote

**Strani jezik:** Engleski jezik, talijanski jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija