Promjene debljine epidermisa i kožne inervacije uzrokovane dijabetesom tijekom starenja

Viđak, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:504009

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Marin Viđak

PROMJENE DEBLJINE EPIDERMISA I KOŽNE INERVACIJE UZROKOVANE DIJABETESOM TIJEKOM STARENJA

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Livia Puljak, dr. med.

U Splitu, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Marin Viđak

PROMJENE DEBLJINE EPIDERMISA I KOŽNE INERVACIJE UZROKOVANE DIJABETESOM TIJEKOM STARENJA

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Livia Puljak, dr. med.

U Splitu, srpanj 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu. Znanstveni je rad proveden zahvaljujući financijskoj potpori Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ), temeljem projekta broj 02.05./28.

Kazalo

1.	**UVOD……...**	1
1.1.	Šećerna bolest	2
1.2.	Životinjski modeli šećerne bolesti	3
1.2.1	Model tipa 1	3
1.2.2	Model tipa 2	4
1.2.3	Procjena dijabetičke neuropatije u animalnih modela	4
1.3.	Bol	5
1.4.	Dijabetička neuropatija	6
1.4.1	Mehanizmi nastanka dijabetičke neuropatije	7
1.5	Kožna inervacija, bol i dijabetes	7
2.	**CILJ RADA I HIPOTEZE……**	9
3.	**ISPITANICI I POSTUPCI……**	11
3.1.	Eksperimentalne životinje	12
3.2.	Postupci	12
3.2.1	Indukcija dijabetesa	12
3.2.2	Obrada tkiva	12
3.3.	Imunohistokemija	13
3.3.1.	Statistička obrada	13
4.	**REZULTATI ……**	15
5.	**RASPRAVA ……...**	20
6.	**ZAKLJUČAK ……**	23
7.	**LITERATURA ……..**	25
8.	**SAŽETAK ……..**	31
9.	**SUMMARY ……**	33

10. ŽIVOTOPIS ……... 35

Popis kratica

CON	Kontrolna skupina
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
DM	lat. Diabetes mellitus; šećerna bolest
GLUT 2	Transmembranski transporter glukoze
IASP	engl. International Association for the Study of Pain; Međunarodna udruga za istraživanje boli
IENF	engl. Intraepidermal nerve fibers; Intraepidermalna živčana vlakna
PBS	engl. Phosphate-buffered saline; Zasoljeni fosfatni pufer
PGP 9,5	engl. Protein gene product 9,5; Proteinski produkt gena 9,5
SD	Standardna devijacija
STZ	Streptozotocin

1. UVOD

1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest tj. dijabetes mellitus (DM) je skupina bolesti koju karakterizira stanje hiperglikemije, odnosno povećane razine glukoze u krvi. Dva najčešća oblika DM su dijabetes tip 1 i tip 2. Dijabetes tipa 1 je posljedica potpunog nedostatka inzulina, dok je dijabetes tipa 2 heterogena skupina poremećaja koju karakterizira različit stupanj inzulinske rezistencije, poremećaj lučenja inzulina i pojačano stvaranje glukoze. Uz navedene, mogući su specifični oblici bolesti poput dijabetesa uzrokovanog oštećenjem gušterače (1).

Prema procjenama, u svijetu je 2014. godine od DM bolovalo 387 milijuna ljudi, a smatra se da je zbog DM umrlo 4,9 milijuna ljudi. Smatra se da će do 2035. godine 592 milijuna odraslih bolovati od DM (2). U Republici Hrvatskoj u 2014. godini sveukupno je registrirano 260.092 osoba oboljelih od DM (3). U svijetu, tako i u Republici Hrvatskoj, većina boluje od DM tipa 2 (2, 3).

Svi oblici DM, kako urođeni tako i stečeni, karakterizirani su hiperglikemijom, relativnim ili apsolutnim manjkom inzulina i razvojem mikrovaskularnih patoloških promjena retine, u glomerulima i na perifernim živcima. DM je povezan s ubrzanim razvojem ateroskleroske makrovaskularne bolesti koja zahvaća arterije koje opskrbljuju srce, mozak i donje ekstremitete. Patološki, ovakve promjene su nalik aterosklerotskoj bolesti nedijabetičara, ali u dijabetesu su patološke promjene naglašenije i brže se razvijaju. Zbog navedenog, DM je danas vodeći uzrok sljepoće u odraslih i vodeći uzrok bubrežnog zatajenja (4). Velik problem je i povećani rizik oboljelih od DM od kardiovaskularnih i koronarnih bolesti, osobito u onih koji pokazuju i znakove bubrežne bolesti (5).

Podaci iz kliničkih istraživanja i ispitivanja na životinjskim modelima ukazuju da je kronična hiperglikemija središnji čimbenik u razvoju mikrovaskularne bolesti (6). Da bi kronična hiperglikemija imala utjecaj stanice, mora doći i do porasta unutarstaničnih razina glukoze. Više od 60% oboljelih od DM ima kliničke znakove neuropatije, koja se može prezentirati kao distalna simetrična polineuropatija, mononeuropatija i autonomna neuropatija s različitim ispadima (4). Učestalost, kao i zdravstveno-ekonomske posljedice DM i komplikacija ukazuju na važnost istraživanja DM-a.

1.2. Životinjski modeli šećerne bolesti

DM složeni je endokrinološko-metabolički poremećaj koji uključuje različite organske sustave i utječe na cijeli organizam, što predstavlja izazov prilikom izbora životinjskih modela.

1.2.1. Model tipa 1

DM tip 1 karakterizira autoimuno oštećenje beta stanica gušterače, što dovodi do smanjenog ili potpunog prekida lučenja inzulina. U životinjskim modelima takvo se oštećenje može postići na različite načine, bilo kemijskom ablacijom beta stanica gušterače ili selektivnim uzgojem životinja koje spontano razvijaju autoimuni dijabetes. DM se inducira 5 - 7 dana prije početka ispitivanja kako bi se osigurala stabilna hiperglikemija. Nedostatak kemijske indukcije dijabetesa je u mogućem utjecaju primijenjenih kemikalija na druga tkiva i na citokromski jetreni sustav (7).

Za uzrokovanje DM u životinjskim modelima u kojima se dijabetogenim tvarima unište beta stanice najčešće se koriste streptozotocin (STZ) ili aloksan. Zbog njihove strukturne sličnosti s glukozom, najčešće se primjenjuju nakon perioda gladovanja (7). Streptozotocin, nakon intraperitonealne ili intravenske primjene, ulazi u stanice gušterače preko GLUT2 transportera. Kad se nađe unutar stanica, STZ dovodi do alkilacije DNA i aktiviranja dušikovih i kisikovih radikala. Oštećenje je posredovano pretežno oštećenjem DNA, a sinergističko djelovanje radikala pomaže destrukciji beta-stanica (8). Aloksan, drugi često primjenjivani dijabetogeni spoj u životinjskih modela, nakon primjene ulazi u stanice jetre i gušterače. Unutar stanice dovodi do stvaranja slobodnih radikala, protiv kojih beta stanice gušterače nemaju obrambenih mehanizama. Uz to, dolazi do poremećaja homeostaze unutarstaničnog kalcija. Povišena razina kalcija prvo dovodi do prolaznog pojačanog lučenja inzulina a zatim, zajedno s kisikovim radikalima i do selektivnog oštećenja beta stanica (8).

Otkrićem NOD (engl. *non-obese diabetic*) miša i BB (engl. *BioBreed*ing) štakora sklonog razvoju DM omogućeno je dodatno istraživanje dijabetesa. Radi se o životinjskim modelima koji spontano razvijaju dijabetes tipa 1 posredovan T-limfocitima (9). Da se radi o imunološki posredovanom dijabetesu ukazuje i činjenica da primjena ciklosporina, koji je imunosupresiv, sprječava pojavu dijabetesa (10)

Uzgojem AKITA miševa omogućen je i genetski uzrokovan dijabetes tipa 1. Takav model ne zahtijeva primjenu kemijskih tvari koji bi mogli utjecati na sami ishod ispitivanja

(11). Osim navedenim postupcima, životinjski modeli za istraživanje DM tipa 1 mogu se proizvesti i primjenom virusa (12), dok se kod većih životinja primjenjuje parcijalna ili potpuna pankreatikotomija, pridružena primjenom kemijskih dijabetogena (7).

1.2.2. Model tipa 2

DM tipa 2 karakteriziraju inzulinska osjetljivost i nemogućnost beta stanica da adekvatno odgovore na potrebe organizma na glukozu. Zbog toga su životinjski modeli DM tipa 2 zapravo modeli inzulinske rezistencije i/ili djelomičnog oštećenja beta stanica. Mnogi su životinjski modeli DM2 pretili, a povećana tjelesna masa prati i razvoj dijabetesa tipa 2 kod ljudi. Pretilost može biti posljedica mutacija koje se javljaju i u prirodi, genetske manipulacija ili inducirana prehranom mastima (7). Među najčešće korištenim životinjskim modelima DM tipa 2 su oni s kongentalnim poremećajem leptina ili leptinskih receptora. Takve životinje postaju pretile zbog hiperfagije, a do koje dolazi zbog abnormalnog signaliziranja posredovanog leptinom ili leptinskim receptorom. Za razliku od ljudi, takav životinjski model temelji se na monogenskoj mutaciji, a fenotip DM tipa 2 kod njih je sekundarna pojava, uzrokovana pretilošću (13). Primjeri monogenskih leptinskih animalnih modela su *Lep* i *Lepr* vrsta miša, te *Zucker fatty* i *Zucker diabetic fatty* štakori (7).

Osim navedenih monogenskih, razvijeni su i poligenski modeli DM tipa 2. Još uvijek se istražuje koji su geni odgovorni za razvoj dijabetesa (14). Primjeri poligenskih modela DM tipa 2 su *KK* vrsta miševa i *New Zealand Obese* (NZO) štakori (7).

DM tipa 2 je kod životinja moguće uzrokovati i visokomasnom prehranom. Takva prehrana dovodi do pretilosti, hiperinzulinemije i poremećaja metabolizma glukoze zbog nedovoljnog lučenja inzulina (15). Kako je pretilost češće uzrokovana okolišnim čimbenicima nego genima, smatra se da takvi modeli preciznije odgovaraju pretilosti kod ljudi od životinjskih modela čija je pretilost genetski uvjetovana (7).

Uz navedene, postoje i životinjski modeli dijabetesa tipa 2 koji nisu fenotipski pretile, ali pokazuju poremećaj funkcije beta stanica gušterače. Takvi modeli imaju, kako smanjenu ukupnu masu, tako i različite defekte beta stanica (16) Uz različite modele miševa i štakora, u uporabi su još i pustinjski skočimiš i nilski poljski štakor (*Nile Grass rat*) (7).

1.2.3. Procjena dijabetičke neuropatije u animalnih modela

Za istraživanje perifernih dijabetičkih neuropatija koristi se model štakora kod kojih se dijabetes izaziva pomoću STZ-a. U istraživanju neuropatske boli koristi se nekoliko

bihevioralnih testova, koji se rutinski primjenjuju na životinjskim modelima, a uključuju mehaničnu alodiniju i toplinsku hiperalgeziju (17). Raniji odgovor na mehaničke i toplinske podražaje, uz specifične promjene na živcima u dijabetičkih štakora, odgovara pojavi boli i nestanku perifernih živčanih vlakana u pacijenata s kroničnom šećernom bolešću (18).

1.3. Bol

Prema definiciji Međunarodne udruge za istraživanje boli (engl. *International Association for the Study of Pain* – IASP), bol je neugodno osjetno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili opisano u kontekstu takvog oštećenja (19). Percepcija boli je uvijek subjektivna i na nju utječu različiti čimbenici. Jednak podražaj može dovesti do različitih odgovora u iste jedinke pod različitim uvjetima. Bol nije direktna ekspresija osjeta već je posljedica iscrpne moždane integracije različitih živčanih impulsa. Zbog individualne i subjektivne prirode boli, liječenje i procjena boli težak su klinički zadatak (20). Stvaran ili potencijalni podražaj koji može oštetiti tkivo, a informaciju o njemu prenose i kodiraju primarni nociceptivni aferentni neuroni naziva se nocicepcijski podražaj (19). Mnogi organi na periferiji, uključujući kožu i potkožna tkiva posjeduju specijalizirane osjetne receptore koje aktivira štetni podražaj. Za razliku od specijaliziranih receptora za lagani dodir ili pritisak, većina nociceptivnih receptora su slobodni živčani završeci (20).

Bol je ozbiljan zdravstveni i ekonomski problem. U SAD-u su ukupni troškovi zbog boli tijekom 2010. godine procijenjeni na 261 do 300 milijardi američkih dolara. Ti su troškovi još veći ako se ubroje i dani bolovanja, gubitak radnih sati i niža plaća (21). Kronična bol je povezana i s pojavom velike depresivne epizode (engl. *major depressive disorder* – MDD) i nesanice (22).

Akutna i kronična bol različiti su klinički entiteti. Akutnu bol uzrokuje konkretna bolest ili ozljeda, ima svoju biološku svrhu i samoograničavajuća je. Kronična bol je ona koja traje dulje od uobičajenog vremena liječenja, i bolest je sama po sebi (23). Kronična se bol najčešće definira kao ona trajanja duljeg od tri mjeseca (19). Kronična je bol često posljedica oštećenja perifernog tkiva i/ili trajne upale (upalna bol); ili patološke prilagodne perifernog ili centralnog živčanog sustava (neuropatska bol) (24). Poseban oblik neuropatske boli, koji nastaje u sklopu DM, naziva se dijabetička neuropatija (25).

Liječenje boli ozbiljan je problem i veliki izazov u modernoj medicini. Naročito je složeno liječenje kronične boli. Zbog svojeg utjecaja na kvalitetu života svakog oboljelog, liječenje kronične boli smatra se nužnim (26). Najčešće korišteni lijekovi u liječenju akutne boli su nesteroidni antireumatici (tj. nesteroidni antiupalni lijekovi), a za liječenje teže akutne boli primjenjuju se opiodni lijekovi, samo stalno ili u kombinaciji s nesteroidnim antireumaticima. U liječenju kronične boli koriste se antidepresivi (naročito triciklični antidepresivi), antiepileptici te opioidni lijekovi u bolesnika s malignom kroničnom boli (1, 27).

1.4. Dijabetička neuropatija

Dijabetička neuropatija je heterogena skupina poremećaja koja ima široki spektar simptoma, a koju karakterizira gubitak i/ili oštećenje perifernih živaca (distalno ka proksimalno) i zbog toga gubitak živčane funkcije (25). Učestalost neuropatije u pacijenata koji boluju od DM je otprilike 30%, a gotovo polovica njih će razviti neuropatiju za vrijeme trajanja bolesti (28). Uz to, 56% pacijenata s idiopatskom neuropatijom ima poremećenu toleranciju glukoze, iako je neuropatija kod njih blaža nego ona povezana s DM (29). Pacijenti često opisuju svoje simptome kao osjećaj „žarenja“ (30).

Dijabetička neuropatija je najčešći oblik periferne neuropatije u razvijenim zemljama. Pacijenti koji boluju od periferne neuropatije pod povećanim su rizikom od razvoja ulceracija na stopalu te posljedično nekroza zbog čega je često indicirana amputacija donjeg ekstremiteta (31). Zbog simptoma koje uzrokuje, dijabetička neuropatija negativno utječe na kvalitetu života pacijenata (32). Procijenjeni trošak u SAD-u zbog dijabetičke neuropatije i njenih posljedica je između 4,6 i 13,7 milijardi dolara (33). Trenutno jedini dostupni oblici liječenja oboljelima od dijabetičke neuropatije su poboljšana kontrola glukoze u krvi i simptomatsko liječenje boli (34). Intenzivna kontrola razine glukoze u krvi naročito je važna u DM tip 1 jer značajno sprječava razvoj kliničke neuropatije (35).

U simptomatskom liječenju dijabetičke neuropatije koristi se nekoliko skupina lijekova. Koriste se antiepileptici (antikonvulzivi), antidepresivi (triciklički antidepresivi i selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina), blokatori ionskih kanala, opioidni analgetici i različiti oblici lokalnih pripravaka (isosorbid nitrat u spreju, kapsacain) (36).

Dijabetička neuropatija složene je etiologije, koja još nije do kraja razjašnjena. Kronična hiperglikemija, hipertenzija, dislipidemija, inzulinska rezistencija i uremija smatraju se ključnima u patogenezi dijabetičke neuropatije jer utječu na gensku ekspresiju, transport molekula, upalu i oksidativni stres (37). Te patološke promjene dovode do mikrovaskularnih poremećaja te oštećenja na razini aksona i ganglija dorzalnih korjenova. Zbog svega navedenog, jasno je da će buduće terapijske opcije dijabetičke neuropatije biti ograničene dok se patogeneza jasnije ne utvrdi (38).

1.4.1 Mehanizmi nastanka dijabetičke neuropatije

Kao što je već navedeno, nastanak dijabetičke neuropatije složen je proces. Oštećenje stanica u dugotrajnom dijabetesu tradicionalno se pripisuje četirima različitim mehanizmima: patološkom procesu aktivacije aldolne reduktaze, glikacijom bjenančevina, aktivacijom unutarstaničnog proteina protein kinaze C, te preusmjeravanjem staničnog metabolizma na heksozaminski put glukoze, što dovodi do poremećaja izražaja gena i rada enzima u stanici (4). U novije vrijeme pokušava se ujediniti te patološke procese u jednu teoriju, pa novija istraživanja pokazuju kako su navedeni mehanizmi uvjetovani oksidativnim stresom (4, 39). Povišene razine unutarstanične glukoze dovode do povećanog oksidativnog stresa, što dovodi do poremećaja unutarstaničnog metabolizma, što dovodi do promjena razine gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (40, 41).

Oštećenje živčanih stanica u stanjima dugotrajne hiperglikemije zaseban je problem. Uz navedene patogene procese, smatra se kako je ključni unutarstanični posrednik u razvoju dijabetičke neuropatije kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII) (42). Premda se navedene promjene događaju duž cijelog tijela neurona, čini se kako su naročito pogođene nodalne regije živčanih stanica perifernih živčanih vlakana, područja intenzivne lokalne unutarstanične metaboličke aktivnosti (43). Važno je istraživati mehanizme nastanka dijabetičke neuropatije kako bi se otkrili mogući novi farmakološki pristupi liječenju, jer bi terapija temeljena na mehanizmima nastanka dijabetičke neuropatije mogla znatno unaprijediti mogućnosti liječenja bolesnika (44).

1.5. Kožna inervacija, bol i dijabetes

U koži su smješteni brojni živčani završeci i osjetni receptori. Razlikuju se po funkciji i po obliku (imaju li kapsulu ili ne). Neenkapsulirani receptori su Merkelove stanice (služe za

osjet laganog dodira), slobodni živčani završetci (osjet boli) te osjetni spletovi uz korijen dlaka (osjet kretanja dlaka). Enkapsulirani receptori su Meissnerova tjelešca (lagani dodir), Vater-Pacinijeva tjelešca (grubi dodir i pritisak, vibracija), Krauseova tjelešca (vibracije) i Ruffinijeva tjelešca (rastezanje i izvrtanje kože) (45, 46).

U pacijenata s neuropatijom koji imaju poremećenu toleranciju glukoze pretežno su zahvaćena mala živčana vlakna i to je možda prvi znak neuropatije u poremećaju metabolizma glukoze. Uz to, poremećaj metabolizma glukoze je povezan sa smanjenjem u gustoći intraepidermalnih živaca (29). Dijabetička neuropatija se najčešće klinički procjenjuje provjerom brzine provođenja velikih živčanih vlakana, dok mala živčana vlakna uglavnom ostanu neprocijenjena. Unatoč tome, procjena oštećenja malih živčanih vlakana od iznimne je važnosti, ali ih je i klinički teže ispitati (47).

Hiperglikemija i poremećaj inzulinskog signaliziranja mogu biti izravno uključeni u patogenezu kroničnih komplikacija dijabetesa povezanih s kožom tako što dovode do poremećaja iskorištavanja glukoze u keratinocitima i negativno utječu na proliferaciju i diferencijaciju stanica kože (48). Nadalje, hiperglikemija potiče razvoj slobodnih kisikovih radikala što dovodi do imunoloških reakcija i poremećaja signalne sprege u keratinocitima (49).

Ipak, većina dosadašnjih istraživanja na koži dijabetičkih štakora bila je kratkog trajanja, što znači da ne mogu pružiti dovoljno informacija o bolesti koja je po svojoj definiciji kronična.

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti promjene u koži, uključujući debljinu epidermisa i distribuciju perifernih živčanih vlakana u dugoročnom eksperimentalnom dijabetesu, u Sprague-Dawley štakora 6 i 12 mjeseci nakon izazivanja modela dijabetesa tipa 1 streptozotocinom.

Specifični ciljevi rada su istražiti u modelima dijabetesa tipa 1 te njihovim kontrolama:

- razinu glukoze u plazmi
- tjelesnu masu
- debljinu epidermisa
- gustoću intraepidermalnih živčanih vlakana

Hipoteze istraživanja su:

- razina glukoze u plazmi će se značajno povećati u DM1 štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom,
- tjelesna masa DM1 štakora će se značajno smanjiti, u usporedbi s kontrolnom skupinom,
- epidermis će se značajno stanjiti u dijabetičkih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom 6 i 12 mjeseci nakon početka pokusa,
- gustoća intraepidermalnih živčanih vlakana u dijabetičkih štakora bit će značajno manja u usporedbi s kontrolnom skupinom 6 i 12 mjeseci nakon početka pokusa.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanje su uključeni mužjaci Sprague-Dawley vrste štakora tjelesne mase 160-200 g na početku pokusa. Životinje su držane u kontroliranim uvjetima (temperatura: 22 +/- 1°C; raspored svjetla: 12 sati svjetla i 12 sati mraka) u nastambi Medicinskog fakulteta u Splitu. Štakori su držani u plastičnim kavezima ispunjenih mješavinom piljevine i mrvljenog kukuruza u omjeru 3:1. Trajanje istraživanja bilo je 6 i 12 mjeseci od izazivanja dijabetesa. Štakori su podijeljeni u 4 skupine: 6-mjesečni štakori s DM (N=5), 6-mjesečna kontrola (N=5), 12-mjesečni DM (N=5) i 12-mjesečna kontrola (N=5).

Sve postupke i protokole istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu. Skrb o životinjama provodila se u skladu sa smjernicama ustanove.

3.2. Postupci

3.2.1. Indukcija dijabetesa

DM tipa 1 izazvan je prema opisanoj, već dobro utvrđenoj eksperimentalnoj metodi (50, 51). Nakon cjelonoćnog gladovanja štakorima je intraperitonealno ubrizgano 55mg / kg streptozotocina svježe spravljenog u otopini citratnog pufera (pH = 4,5). Kontrolnoj je skupini ubrizgan čisti citratni pufer. Svi su štakori hranjeni *ad libitum* uobičajenom laboratorijskom hranom (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija).

Tjelesna masa i razina glukoza u plazmi su mjerene redovito. Za određivanje razine glukoze iz krvi repnih vena korišten je *Single touch* glukometar (One Touch VITa, Life Scan, High Wycombe, Ujedinjeno Kraljevstvo). Tjelesna masa je mjerena tehničkom laboratorijskom vagom.

3.2.2. Obrada tkiva

Na kraju istraživanja štakori su anestezirani (Izofluran; Forane, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Ujedinjeno Kraljevstvo) i žrtvovani. Uzorci kože uzeti su s plantarne površine obaju stražnjih šapa i fiksirani Zambonijevom otopinom [2% paraformaldehid i 15% pikrinska kiselina u 0,01 M zasoljenog fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline* – PBS) uz pH 7,4] kroz 2 do 5 sati pri temperaturi od 4°C. Uzorci su nakon toga prebačeni u 0,01 M PBS. Tkiva su zaštićena od smrzavanja u 30% saharozi preko noći i nakon toga uronjena u medij za smrzavanje (engl. *Optimal Cutting Temperature – OCT*; Tissue Tek,

Tokyo, Japan). Koža je rezana u smjeru okomitom na njenu površinu. Za svaki uzorak kože, uzeti su rezovi od 8 μm i svaki peti je obojan hematoksilinom i eozinom. Za mikroskopiranje rezova korišten je svjetlosni mikroskop (BX61, Olympus, Tokyo, Japan). Mikroskopske fotografije snimljene su pod povećanjem od 40 puta koristeći digitalnu kameru (DP71, Olympus, Tokyo, Japan). U procjeni debljine epidermisa korištena je uobičajena svjetlosna mikroskopija.

Debljina epidermisa je procijenjena koristeći tri reza za svaki uzorak tkiva. Debljina epidermisa je definirana kao okomita udaljenost između dermoepidermalnog spoja i najudaljenjeg vanjskog zrnatog sloja. Na svakoj mikroskopskoj fotografiji, urađeno je 10 mjerenja, od kojih je svako obuhvatilo širinu tkiva od 100 μm uz epidermis kako bi se procijenila prosječna debljina epidermisa. Podaci su obrađeni koristeći računalni program PhotoShop CS3 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, SAD).

3.3.3. Imunohistokemija

Za prikaz perifernih živčanih vlakana korišten je mišji poliklonski antiserum protiv proteinskog produkta gena 9,5 (PGP 9,5) (kat. br. 480012, Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, SAD) razrijeđen u omjeru 1:1000 u PBS-u s dodatkom 0,5% Triton X-100. Primarni antiserum prikazan je sekundarnim biotiniziranim kozjim anti-mišjim protutijelom IgG-B (kat. Bb.. sc-2039, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) razrijeđenim u omjeru 1:1000, nakon kojeg je dodan Streptaviridin (1:500; S-32354, lot 508205, Molecular Probes, Eugene, OR, SAD) razrijeđen u omjeru 1:500. Nakon konačnog ispiranja PBS-om, rezovi su postavljeni na mikroskopska stakla, osušeni na zraku i pokriveni (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Kontrola bojanja je izvršena izostavljanjem primarnog antitijela iz postupka bojenja. Za kvantifikaciju intraepidermalnih živčanih vlakana (eng. intraepidermal nerve fibers, IENF), izabrana su 3 reza kože plantarne strane šape svake pokusne životinje, nakon čega su nasumično odabrana 3 mikroskopska polja. Slike imunohistokemijskih bojanja promatrane su pod povećanjem od 40 puta na fluorescentnom mikroskopu. Broj imunoreaktivnih živčanih vlakana određen je procjenom fluorescencije. Prebrojana su sva uzlazna vlakna u epidermisu, bez obzira na njihovu duljinu, a vlakna koja su se granala u samom epidermisu brojana su kao jedno vlakno. IENF su brojana po poljima izabranima za analizu.

3.3.4. Statistika

Debljina kože i broj IENF izraženi su srednjom vrijednosti +/- standardna devijacija (SD). Tjelesna masa, razina glukoze, debljina epidermisa i imunoreaktivni PGP analizirani su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Bonferronijevim *post hoc* testom. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$.

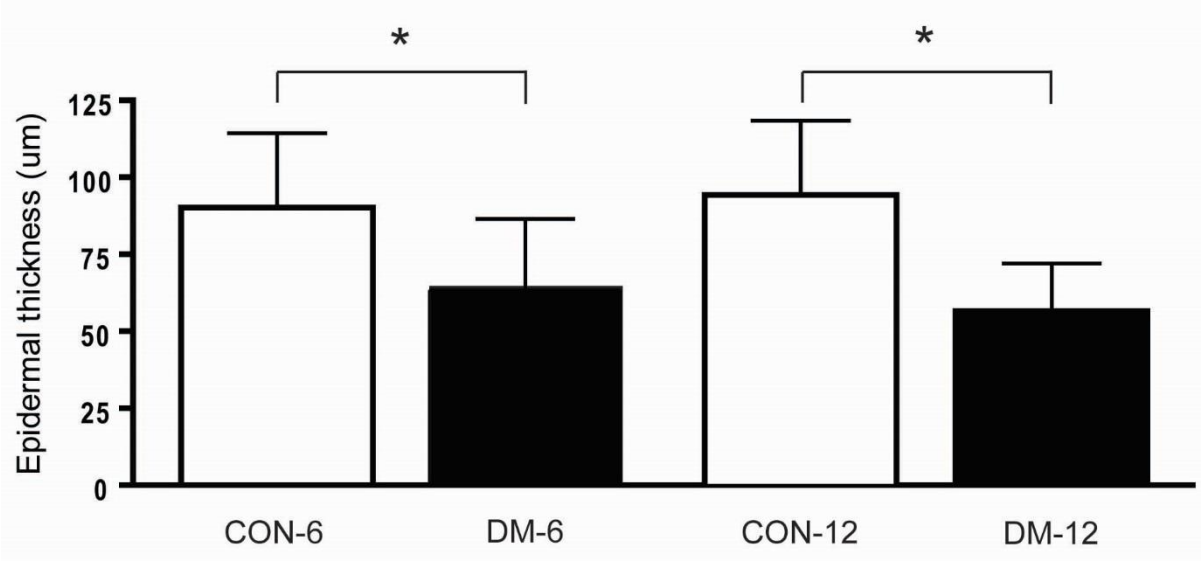
4. REZULTATI

Potvrda izazivanja dijabetesa

Tjedan dana nakon davanja injekcije streptozotocina razina glukoze u DM štakora bila je značajno veća (535,7 +/- 62,3 mg/dl u usporedbi s 116,1 +/- 16,9 mg/dl; $p < 0,001$). Slični su rezultati primijećeni i nakon šest odnosno nakon dvanaest mjeseci (557,6 +/- 45,0 mg/dl u usporedbi sa 101,4 +/- 28,4; $p < 0,001$). Na početku pokusa nije bilo razlike u masi između dijabetičnih i kontrolnih životinja (158,3 +/- 15,0 g u usporedbi s 161,7 +/- 36,8 g; $p > 0,05$). Manja tjelesna masa zamijećena je u štakora u kojih je izazvan DM tipa 1 u usporedbi s kontrolnim skupinama, šest (271,8 +/- 38,2 g u usporedbi s 463,9 +/- 51,9 g; $p < 0,001$) i dvanaest mjeseci od izazivanja dijabetesa (334,8 +/- 46,3 g u usporedbi s 565,8 +/-23,5 g; $p < 0,001$).

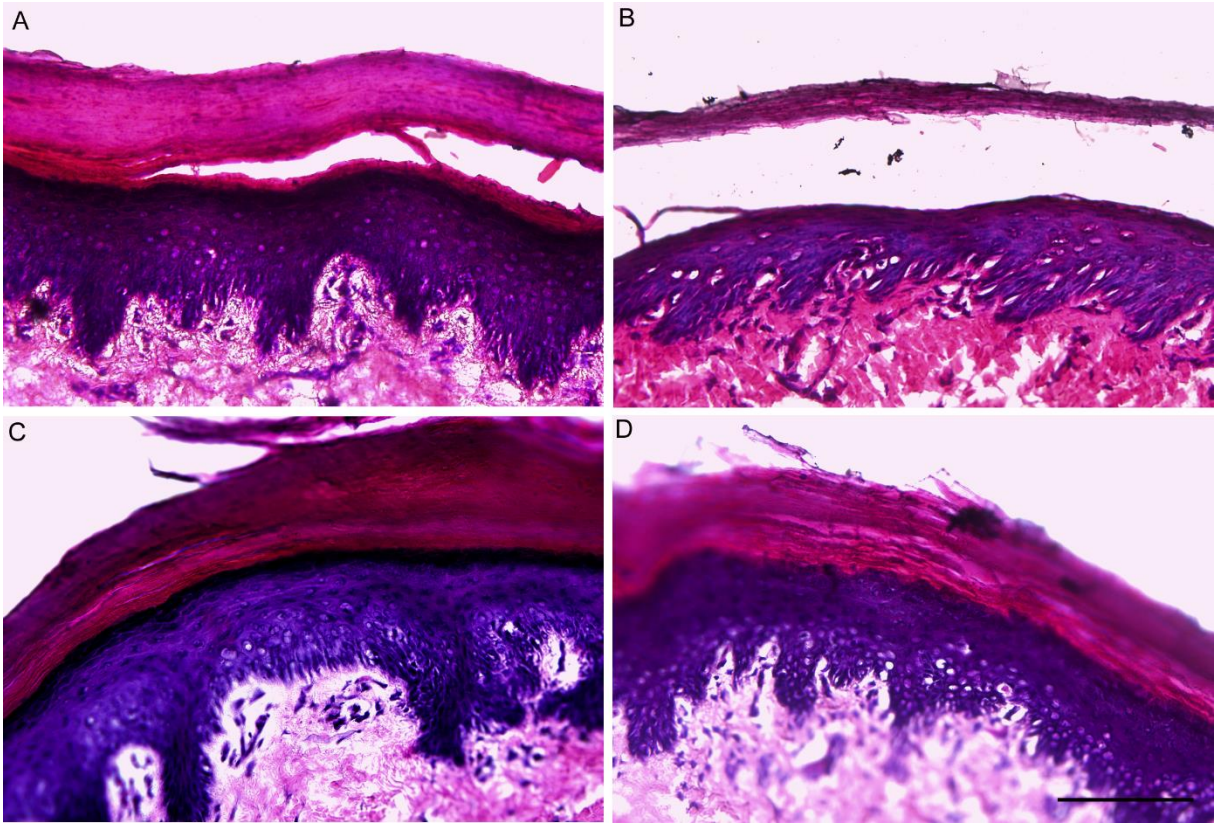
Debljina epidermisa

Početna razina debljine epidermisa iznosila je 74,72 +/- 17,56 um. Šest mjeseci od izazivanja dijabetesa zabilježeno je značajno stanjenje epidermisa ($p < 0,001$) kao i nakon 12 mjeseci ($p < 0,001$). Postotno stanjenje epidermisa iznosilo je 30% nakon 6 mjeseci odnosno 40,2% nakon 12 mjeseci dijabetesa. Nije bilo značajnih razlika u debljini epidermisa između kontrolnih životinja 6 i 12 mjeseci nakon početka pokusa.



Slika 1. Debljina epidermisa u kontrolnim i dijabetičkim štakorima. Zvjezdica označava značajnu statističku razliku ($p < 0,001$). Legenda: CON - 6 = kontrolni štakori u šestomjesečnom ispitivanju, DM - 6 = dijabetički štakori nakon šest mjeseci, CON - 12 =

kontrolni štakori u dvanaestmjesečnom ispitivanju, DM - 12 = dijabetički štakori nakon 12 mjeseci.

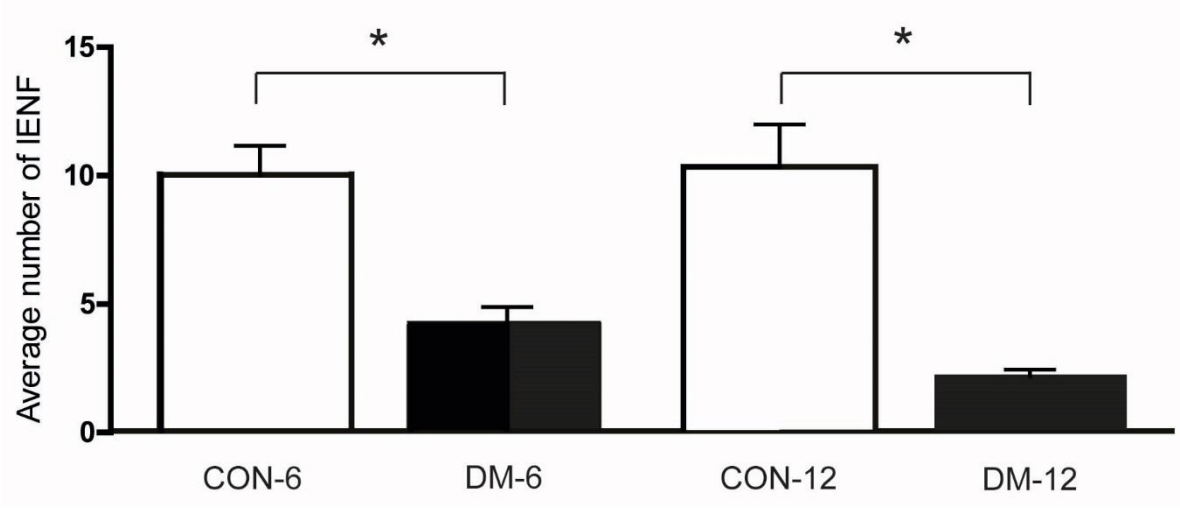


Slika 2. Patohistološki nalaz: A) kontrolnih štakora u šestomjesečnom ispitivanju, B) dijabetičkih štakora nakon šest mjeseci, C) kontrolnih štakora u dvanaestmjesečnom ispitivanju, D) dijabetičkih štakora nakon dvanaest mjeseci. Mjerna ljestvica 100 μm, na svim fotografijama.

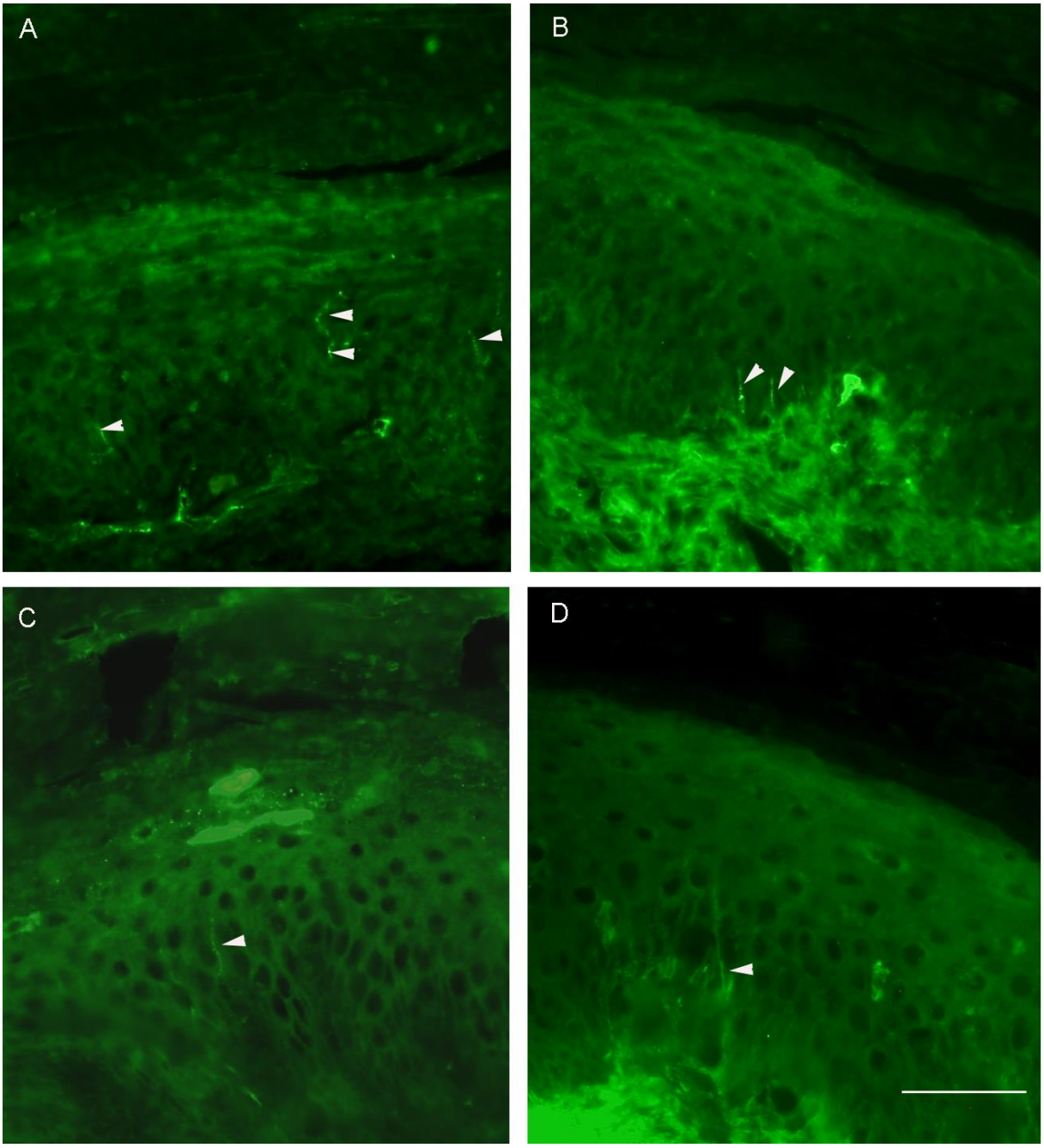
Kvantifikacija broja živčanih vlakana

Početna količina intraepidermalnih živčanih vlakana iznosila je 10,00 +/- 3,39 po mikroskopskom polju. Intraepidermalna živčana vlakna koja su reagirala s PGP-om 9,5 izlazila su iz kožnih živaca i prostirala se okomito prema epidermisu gdje su se terminalno granala. Srednja vrijednost IENF bila je značajno manja u štakora s dijabetesom nakon 6 mjeseci u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$). Dvanaest mjeseci nakon izazivanja dijabetesa prosječni broj IENF bio je još manji u usporedbi s kontrolom ($p < 0,01$). Nije bilo

razlike između dvije kontrolne skupine ($p > 0,05$) niti su kakve razlike u morfologiji intraepidermalnih živčanih vlakana zamijećene za vrijeme istraživanja.



Slika 3. Prosječan broj intraepidermalnih živčanih vlakana u jednom vidnom polju u dijabetičkih i kontrolnih štakora. Prikazan je medijan (M) +/- standardna devijacija. Zvjezdica označava statističkih značajnu razliku ($p<0,05$). Legenda: CON - 6 = kontrolni štakori u šestomjesečnom ispitivanju, DM - 6 = dijabetički štakori nakon šest mjeseci, CON - 12 = kontrolni štakori u dvanaestmjesečnom ispitivanju, DM - 12 = dijabetički štakori nakon 12 mjeseci.



Slika 4. Bojanje PGP-om 9.5 pokazuje epidermalnu inervaciju kože stražnjih šapa kod: A) kontrolnih štakora nakon šest mjeseci, B) dijabetičkih štakora nakon šest mjeseci, C) kontrolnih štakora nakon dvanaest mjeseci i D) dijabetičkih štakora nakon dvanaest mjeseci. Strelice ukazuju na intraepidermalna živčana vlakna.

6. RASPRAVA

Ovo istraživanje je pokazalo da dugotrajni dijabetes melitus izazvan streptozotocinom u Sprague-Dawney štakora dovodi do značajnog stanjenja epidermisa i smanjenja broja živčanih vlakana. U pacijenata sa šećernom bolesti, kožne se manifestacije uglavnom javljaju nakon razvoja dijabetesa, ali mogu biti i prvi simptom ili prethoditi dijagnozi dijabetesa. Promjene na koži mogu se svrstati u četiri velike skupine: bolesti kože povezane s dijabetesom, infekcije, kožne komplikacije dijabetesa i odgovore kože na liječenje šećerne bolesti (52). U ovom su istraživanju analizirane kožne promjene u modelu dugotrajnog dijabetesa, 6 i 12 mjeseci nakon njegova eksperimentalnog izazivanja.

Trenutne patofiziološke spoznaje o bolnim simptomima i znakovima neuropatske boli ukazuju na to da neurološka oštećenja mogu uzrokovati opsežne promjene živčanog sustava, što ih razlikuje od drugih kroničnih boli s očuvanim nociceptivnim sustavom. Nadalje, neuropatska bol ne odgovara na uobičajenu terapiju za nociceptivnu bol, što ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima mehanizama nastanka neuropatske boli (53). Oštećenje grane kožnog perifernog živca dovodi do karakterističnog osjetnog deficita inerviranog područja, a uključuje promjene u osjetu mehaničkih, vibracijskih, bolnih i toplinskih podražaja.

Za procjenu proširenosti neuropatije koristi se biopsija uzoraka kože. Inervacija epidermisa može se procijeniti koristeći različite imunohistokemijske neuronske biljege, posebno PGP 9,5-ubikvitin hidrolazu C-terminalnog kraja (54). Poznato je da osjetni živčani završetci propadaju zbog mehaničkih ili kemijskih oštećenja, a promjene epidermalnih vlakana uslijede prije promjena tijela živca u dermisu (55, 56). Zbog svega toga, biopsija kože s kvantifikacijom intraepidermalnih živčanih vlakana postala je novi postupak u dijagnostici senzorne neuropatije malih živčanih vlakana (57).

Na uzorcima kože u ovom istraživanju dokazano je da dugotrajni dijabetes melitus tijekom starenja štakora dovodi do stanjenja epidermisa i gubitka IENF-a. Ti rezultati su u skladu s ranijim istraživanjima koja su provedena u drugih glodavaca s izazvanim dijabetesom premda su ta istraživanja bila kraćeg trajanja bolesti. Značajno stanjenje epidermisa u miševa s dijabetesom tipa 1 izazvanog streptozotocinom opisano je već u 2. i 4. tjednu od izazivanja dijabetesa, a promjene broja IENF-a nakon 4 tjedna (58). U štakora sa šećernom bolesti tipa 1 izazvane streptozotocinom, ozbiljno smanjenje inervacije kože plantarne strane šape primijećeno je nakon 11 tjedana od induciranja dijabetesa, iako je nakon pet tjedana primijećena promjena reakcija na nociceptivni podražaj (59). U istraživanju u kojem je ispitivana gustoća živčanih vlakana u koži šape 6 do 24 tjedna od indukcije

dijabetesa, prvo je zamijećen veliki pad gustoće živčanih vlakana u 6. tjednu, nakon čega je slijedila „faza održavanja“ na istoj razini gustoće inervacije idućih 6 tjedana, a nakon toga ponovno smanjenje razine gustoće do 24. tjedna. Autori su zaključili kako progresivno smanjenje kožne inervacije održava veliko oštećenje živaca u ovom životinjskom modelu (60).

Upravo kao što je smanjenje gustoće živčanih vlakana primijećeno od 6 do 24 tjedna od indukcije dijabetesa u štakora (60), u ovom smo istraživanju zapazili trend smanjenja od 6 do 12 mjeseca. U usporedbi s kontrolnom skupinom, šest mjeseci nakon izazivanja dijabetesa epidermis je bio 30%, a nakon 12 mjeseci 40,2% tanji. Do sada ovakva istraživanja nisu provedena na životinjskim modelima u ovoliko dugom trajanju (do 12 mjeseci), kao što je slučaj u ovoj studiji.

Kako je smanjenje gustoće intraepidermalnih živčanih vlakana povezano s povećanim rizikom razvoja neuropatske boli, objektivnost i mjerljivost čini je dobrom mjerom ishoda u istraživanjima u kojima se procjenjuju nove metode liječenja dijabetičke neuropatije (61). Streptozotocinski modeli dijabetesa mogu se koristiti za procjenu normativne vrijednosti IENF gustoće koja se može kasnije koristiti kao vrijednost IENF-a ovisna o dobi prilikom ispitivanja potencijalnih novih načina liječenja.

Kožne morfometrijske promjene poput smanjenja debljine epidermisa i broja intraepidermalnih živčanih vlakana karakteristične su za dijabetičku neuropatiju koja je preduvjet za razvoj dijabetičnog stopala. Prepoznati utjecaj dijabetesa na strukture kože važno je za pacijente koji imaju visoki rizik za razvoj komplikacija na stopalu.

7. ZAKLJUČAK

Zaključno, štakori s dugotrajnim dijabetesom tipa 1 izazvanim streptozotocinom imaju morfometrijske promjene kože koje su karakteristične za dijabetičku neuropatiju i zbog toga se mogu koristiti za buduća farmakološka istraživanja.

Temeljem rezultata istraživanja moguće je zaključiti:

- razina glukoze u plazmi očekivano je porasla u štakorskim modelima dijabetesa tipa 1 i 2 nakon injekcije streptozotocina (STZ),
- masa DM1 štakora nakon primjene streptozotocina (STZ) bila je značajno manja u usporedbi s kontrolnom skupinom,
- debljina epidermisa DM1 štakora bila je značajno manja u usporedbi s kontrolnom skupinom nakon 6 i 12 mjeseci,
- analiza gustoće intraepidermalnih vlakana u DM1 štakora pokazala je značajno smanjenje u usporedbi s kontrolnom skupinom nakon 6 i 12 mjeseci.

8. LITERATURA

1. Powers AC. Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. U: Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J, urednici. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19. izdanje. Sjedinjene Američke Države: McGraw-Hill Education; 2015. str. 2392 - 407.

2. International Diabetes Federation Annual Report 2014 Brussels: International Diabetes Federation; 2015 [citirano 8. 6. 2016]. Dostupno na: http://www.idf.org/sites/default/files/IDF-2014-Annual-Report-final.pdf.

3. Poljičanin T, Kolarić V. Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću CroDiab - National Diabetes Registry Crodiab. 2016. U: Hrvatski zdravstveno - statistički ljetopis za 2015 godinu [Internet]. Zagreb: Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo; [316-8]. Dostupno na: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2016/05/Ljetopis_2015.pdf.

4. Brownlee M, Aiello LP, Cooper ME, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJ. Complications of Diabetes Mellitus. U: Melmed S, Polonsky K, Larsen PR, Kronenberg HM, urednici. William's Textbook of Endocrinology. 12. izdanje. Philadelphia, PA: Elsevier, Saunders; 2011. str. 1462 - 80.

5. Prince CT, Becker DJ, Costacou T, Miller RG, Orchard TJ. Changes in glycaemic control and risk of coronary artery disease in type 1 diabetes mellitus: findings from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study (EDC). Diabetologia. 2007;50(11):2280-8.

6. Group TDCaCTR. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. N Engl J Med. 1993;329:977-86.

7. King AJ. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012;166(3):877-94.

8. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. 2001;50(6):537-46.

9. Yang Y, Santamaria P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. Clinical science. 2006;110(6):627-39.

10. John P. Mordes RB, Elizabeth P. Blankenhorn, Aldo A. Rossini and Dale L. Greiner. Rat Models of Type 1 Diabetes: Genetics, Environment, and Autoimmunity. ILAR Journal 2004;45(3):278-91.

11. Mathews CE, Langley SH, Leiter EH. New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. Transplantation. 2002;73(8):1333-6.

12. Jaïdane H SF, Gharbi J, Aouni M, Romond MB, Hober D. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. Diabetes Metab Res Rev. 2009;25(7):591-603.
13. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. Current diabetes reviews. 2014;10(2):131-45.
14. Schürmann H-GJaA. The genetic basis of obesity-associated type 2 diabetes (diabesity) in polygenic mouse models. Mamm Genome. 2014; 25(9-10)(401–412).
15. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Diabetes. 2004;53 Suppl 3:S215-9.
16. Ostenson CG, Efendic S. Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans. Diabetes, obesity & metabolism. 2007;9 Suppl 2:180-6.
17. TJ. M. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. Curr Protoc Neurosci. 2004 Chapter 9:Unit 9.18.
18. Properzi G FS, Poccia G, Aloisi P, Gu XH, Terenghi G, Polak JM. Early increase precedes a depletion of VIP and PGP-9.5 in the skin of insulin-dependent diabetics--correlation between quantitative immunohistochemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. J Pathol. 1993.;Feb; 169(2).269-77.
19. Puljak L, Sapunar D. Rječnik boli. Split: Laboratorij za istraživanje boli; 2010.
20. Basbaum AI, Jessell TM. Pain. U: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, urednici. Principles of Neural Science. 5. izdanje. Sjedinjene Američke Države: McGraw Hill Medical; 2013. str. 530 - 55.
21. Gaskin DJ RP. The Economic Costs of Pain in the United States. Washington (DC): National Academies Press; 2011. .
22. Emery PC WK, Kowal J. Major depressive disorder and sleep disturbance in patients with chronic pain. Pain Research & Management. The Journal of the Canadian Pain Society. 2014;19(1):35-41.
23. Grichnik KP, Ferrante FM. The difference between acute and chronic pain. The Mount Sinai journal of medicine, New York. 1991;58(3):217-20.
24. Giannina Descalzi DI, Toshikazu Ushijima, Eric Nestler, Venetia Zachariou, Minoru Narita. Epigenetic Mechanisms of Chronic Pain. Trends in Neurosciences. 2015 38(4):237 - 46.
25. Callaghan BC, Hur J, Feldman EL. Diabetic Neuropathy: One disease or two? Curr Opin Neurol. 2014 25(5):536–41.

26. Lynch ME, Watson CP. The pharmacotherapy of chronic pain: a review. Pain research & management : the journal of the Canadian Pain Society = journal de la societe canadienne pour le traitement de la douleur. 2006;11(1):11-38.
27. Rathmell JP, Fields HL. Pain: Pathophysiology and Management. U: Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J, urednici. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19. izdanje. Sjedinjene Američke Države: McGraw-Hill Education; 2015. str. 87 - 95.
28. Maser RE, Steenkiste AR, Dorman JS, Nielsen VK, Bass EB, Manjoo Q, et al. Epidemiological correlates of diabetic neuropathy. Report from Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. Diabetes. 1989;38(11):1456-61.
29. Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. Neurology. 2003;60(1):108-11.
30. Vinik AI, Erbas T, Stansberry KB, Pittenger GL. Small fiber neuropathy and neurovascular disturbances in diabetes mellitus. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. 2001;109 Suppl 2:S451-73.
31. Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. Current pharmaceutical design. 2008;14(10):953-61.
32. Van Acker K BD, De Bacquer D, Weiss S, Matthys K, Raemen H, Mathieu C, Colin IM. Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. Diabetes Metab. 2009;35(3):206–13.
33. Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. Diabetes care. 2003;26(6):1790-5.
34. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. The Lancet Neurology. 2012;11(6):521-34.
35. Brian C Callaghan AAL, Eva L Feldman, and Richard AC Hughes. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. Cochrane Database Syst Rev. 2012 6; CD007543.
36. Wong MC, Chung JW, Wong TK. Effects of treatments for symptoms of painful diabetic neuropathy: systematic review. Bmj. 2007;335(7610):87.
37. Witzel, II, Jelinek HF, Khalaf K, Lee S, Khandoker AH, Alsafar H. Identifying Common Genetic Risk Factors of Diabetic Neuropathies. Frontiers in endocrinology. 2015;6:88.

38. King RH. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. Molecular pathology : MP. 2001;54(6):400-8.
39. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(6865):813-20.
40. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. Diabetes. 1993;42(6):801-13.
41. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(22):12222-6.
42. Ferhatovic L, Jelicic Kadic A, Boric M, Puljak L. Changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in dorsal root ganglia during maturation in long-term diabetes. Histology and histopathology. 2014;29(5):649-58.
43. Zenker J, Ziegler D, Chrast R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. Trends Neurosci. 2013;36(8):439-49.
44. Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. Pharmacological research. 2014;80:21-35.
45. Junqueira LC, Carniero J. Koža. U: Bradamente Ž, Kostović-Knežević L, urednici. Osnove histologije, udžbenik i atlas. 13. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 369-83.
46. Kahle W. Funkcionalni sustavi. U: Vinter I, urednik. Treći svezak: Živčani sustav i osjetila. Priručni anatomski atlas u tri sveska. 8. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 306-35.
47. Eirik Søfteland CB, Jens B. Frøkjær, Jan Brøgger, László Madácsy, Odd H. Gilja, Lars Arendt-Nielsen, Magnus Simrén, Asbjørn M. Drewes, Georg Dimcevski. Association between visceral, cardiac and sensorimotor polyneuropathies in diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications. 2013;Volume 28 (Issue 3):370 - 7.
48. Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. Diabetes. 2001;50(7):1627-35.
49. Cheng-Che E. Lan C-SW, Shu-Mei Huang, I-Hui Wu, Gwo-Shing Chen. High-Glucose Environment Enhanced Oxidative Stress and Increased Interleukin-8 Secretion From Keratinocytes: New Insights Into Impaired Diabetic Wound Healing. Diabetes. 2013 July;62(7):2530–8.

50. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Kurir TT, Novak A, Vrdoljak L, et al. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. Anesthesia and analgesia. 2013;116(3):712-21.
51. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. Sex differences in pain-related behavior and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglia of rats with diabetes type 1 and type 2. Acta histochemica. 2013;115(5):496-504.
52. Ferringer T, Miller F, 3rd. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. Dermatologic clinics. 2002;20(3):483-92.
53. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. The Lancet Neurology. 2010;9(8):807-19.
54. Wilson PO, Barber PC, Hamid QA, Power BF, Dhillon AP, Rode J, et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. British journal of experimental pathology. 1988;69(1):91-104.
55. Hsieh ST, Chiang HY, Lin WM. Pathology of nerve terminal degeneration in the skin. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2000;59(4):297-307.
56. Rajan B, Polydefkis M, Hauer P, Griffin JW, McArthur JC. Epidermal reinnervation after intracutaneous axotomy in man. The Journal of comparative neurology. 2003;457(1):24-36.
57. Kennedy WR, Said G. Sensory nerves in skin: answers about painful feet? Neurology. 1999;53(8):1614-5.
58. Beiswenger KK, Calcutt NA, Mizisin AP. Dissociation of thermal hypoalgesia and epidermal denervation in streptozotocin-diabetic mice. Neuroscience letters. 2008;442(3):267-72.
59. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(3):823-8.
60. Chu CC, Wang SD, Chiang JS, Ho ST. Generalized depletion of free nerve endings and decrease of cutaneous nervous innervation in streptozotocin-induced painful and painless diabetic rats. Journal of the Chinese Medical Association : JCMA. 2012;75(7):314-21.
61. Umapathi T, Tan WL, Loke SC, Soon PC, Tavintharan S, Chan YH. Intraepidermal nerve fiber density as a marker of early diabetic neuropathy. Muscle & nerve. 2007;35(5):591-8.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Smanjenje broja perifernih živčanih vlakana u pacijenata s kroničnim dijabetesom mellitusom (DM) povezano je sa simptomima neuropatije, razvojem boli, ulceracija stopala i amputacijama donjih ekstremiteta. Cilj ovog rada je bio procijeniti kožne promjena, uključujući promjene u debljini epidermisa na šapi i u gustoći intraepidermalnih živčanih vlakana (engl. *intraepidermal nerve fibers* – IENF) u dugotrajnom dijabetesu u štakora, 6 i 12 mjeseci nakon izazivanja dijabetesa.

Materijali i metode: Debljina epidermisa i gustoća IENF istraživana je u Sprague-Dawley dijabetičkih štakora 6 i 12 mjeseci nakon izazivanja dijabetesa streptozotocinom. Debljina epidermisa je procijenjena hematoksilinskim i eozinskim bojanjem. Periferna živčana vlakna bojana su poliklonalnim antiserumom za PGP 9,5. Uspješnost izazivanja dijabetesa provjeravana je mjerenjem glukoze u plazmi i tjelesne mase štakora tijekom eksperimenta.

Rezultati: Ovo je istraživanje pokazalo kako je dugotrajni dijabetes izazvan streptozotocinom u Sprague-Dawley štakora karakteriziran značajnim stanjenjem epidermisa i smanjenjem broja intraepidermalnih živčanih vlakana 6 i 12 mjeseci nakon indukcije dijabetesa.

Zaključak: Štakori s dugotrajnim dijabetesom tipa 1 izazvanim streptozotocinom imaju morfometrijske promjene kože koje su karakteristične za dijabetičku neuropatiju i zbog toga se mogu koristiti za buduća farmakološka istraživanja.

9. SUMMARY

Changes in epidermal thickness and cutaneous innervation during maturation in long-term diabetes

Aim: Peripheral nerve fiber depletion in patients with chronic diabetes mellitus (DM) was linked to neuropathic symptoms, development of pain, foot ulcerations and lower extremity amputation. The aim of this study was to analyze cutaneous changes, including paw epidermal thickness and intraepidermal nerve fiber (IENF) density in long-term diabetes, in rats 6 months and 12 months after induction of diabetes.

Materials and methods: Epidermal thickness and IENF density were studied in Sprague-Dawley diabetic rats 6 months and 12 months after diabetes induction with streptozotocin. Epidermal thickness was evaluated using hematoxylin and eosin staining. Peripheral nerve fibers were stained with polyclonal antiserum against protein gene product 9.5 (PGP 9.5). Successful diabetes induction was validated by measuring plasma glucose and body mass regularly throughout the experiment.

Results: This study showed that long-term diabetes, induced in Sprague-Dawley rats with streptozotocin, is characterized with significant epidermal thinning and reduction of intraepidermal nerve fibers, 6 months and 12 months after induction of diabetes.

Conclusion: Long-term studies of streptozotocin models of diabetes could be used for making normative IENF densities that can be later used as age-dependent normative values for studying new treatment modalities.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marin Viđak

Adresa: Popovića 1, 21 000 Split

Elektronička pošta: marin.vidjak@gmail.com

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Datum i mjesto rođenja: 15. listopada 1991.

OBRAZOVANJE

- 1998. – 2006. Osnovna škola „Dobri“ u Splitu
- 2006. – 2010. II. jezična gimnazija u Splitu
- 2010. – 2016. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- Engleski jezik (C1)
- Talijanski jezik (A2)
- Njemački jezik (A2)

STUDENTSKE AKTIVNOSTI

- Član organizacijskog odbora Festivala znanosti 2010 – 2016
- Član Studentskog zbora i predstavnik studenata u Fakultetskom vijeću Medicinskog fakulteta u Splitu 2010 – 2012; 2014 – 2016
- Studentski pravobranitelj 2014 – 2016
- Studentski urednik fakultetskog časopisa “Glasnik” 2012 – 2016
- Demonstrator pri katedri za Imunologiju i medicinsku genetiku 2012 – 2015
- Demonstrator pri katedri za Medicinsku biologiju 2011 – 2014
- Demonstrator pri katedri za Histologiju i embriologiju 2011 – 2013

PUBLIKACIJE

- Jelicic Kadic A, Boric M, **Vidak M**, Ferhatovic L, Puljak L. Changes in epidermal thickness and cutaneous innervation during maturation in long-term diabetes. J Tissue Viability. 2014;23(1):7-12.

NAGRADE I PRIZNANJA

- Dobitnik Rektorove nagrade za promicanje znanosti 2013. godine