

# Promjene prisutnosti i raspodjele obje podjedinice feritina u nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom

---

**Dolić, Valentina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:269937>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Valentina Dolić

Promjene prisutnosti i raspodjele obje  
podjedinice feritina u nefrotoksičnosti  
uzrokovanoj cisplatinom

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za toksikologiju (ZT) na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI). Navedeno istraživanje koristilo je arhivske uzorke i saznanja prikupljena u sklopu projekta „Mehanizmi toksičnosti teških metala u bubrezima i spolnom traktu“ (Projekt MZOS). Radnja je proizašla iz trenutne aktivnosti na projektu „Procjena učinkovitosti i toksičnosti biološki aktivnih tvari (BioMolTox)“ te u objektu i na opremi nabavljenoj u sklopu projekta KK.01.1.1.02.0007, Istraživačko-edukacijski centar za zdravstvenu i medicinsku ekologiju i zaštitu od zračenja – rekonstrukcija i nadogradnja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada“, pod stručnim vodstvom dr. sc. Marije Ljubojević, znanstvene savjetnice, te suvoditeljstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovnom-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja sveučilišnog magistra eksperimentalne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Promjene u prisutnosti i raspodjeli obje podjedinice feritina u nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom**

Valentina Dolić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cisplatina, planarni platinski kompleks, uspješan je kemoterapeutik za liječenje solidnih tumora. Vezanjem cisplatine za DNA dolazi do smrti neoplazmi, ali je primjena ograničena nefrotoksičnošću koja rezultira smanjenjem ili gubitkom funkcije bubrega. Od brojnih mehanizama koji doprinose nefrotoksičnosti, oksidativni stres je među izraženijim. Željezo je esencijalni element koji bubrezi nakupljaju kroz vrijeme jer se ono ne izlučuje. Time je pojačana pohrana željeza u nanokavezima feritina u proksimalnim kanalićima nefrona te opasnost od oslobađanja pri staničnom stresu. Nedovoljno je istraženo kako se ekspresija feritina mijenja tretmanom cisplatinom. Najviše oštećenja dožive stanice S3 odsjeka (*pars recta*) proksimalnih kanalića nefrona u eksperimentalnih životinja. Ovim radom cilj nam je utvrditi dolazi li do promjene prisutnosti i raspodjele obje podjedinice feritina u nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom. Nakon jednokratnog tretmana cisplatinom (i.p. u dozi 5 mg/kg) nefrotoksični učinak u muških štakora soja Wistar izražen je 5. dan. S pomoću specifičnih protutijela pratili smo promjene prisutnosti lakog i teškog lanca feritina, koji čine nanokavez, u arhivskim uzorcima homogenata tkiva bubrega western blot metodom. Imunohistokemijskom analizom pratili smo njihovu promjenu u raspodjeli na tkivnim kriosekcijama bubrega. Promjenu u ekspresiji nukleinskih kiselina utvrdili smo end-point RT-PCR tehnikom. Nađeno je povećanje prisutnosti mRNA lakog te proteina lakog i teškog lanca feritina te povećanje i promjena raspodjele koja ukazuje narušen metabolizam feritina kao moguć uzrok oksidativnog stresa. Proces vjerojatno kreće od feritinofagije, razgradnje u lizosomima, preko oslobađanja željeza iz feritina do iterativnog nastanka hidroksid radikala, pa dalje u ferroptozu. Kontrola navedenog, uz pozitivan utjecaj na terapijsku funkciju, poželjan je ishod ovakvog saznanja.

Ključne riječi: autofagocitoza, feritinofagija, lizosomi, prijelazni metali, nanokavez  
(62 stranice, 20 slika, 1 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Marija Ljubojević

Komentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc.

Izv. prof. dr. sc. (prije imena nastavnika navesti njihove titule)

Prof. dr. sc.

Rad prihvaćen: (navesti datum sjednice Povjerenstva za diplomatske radove na kojoj je rad prihvaćen)

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### **Changes in the presence and distribution of the two ferritin subunits in cisplatin nephrotoxicity**

Valentina Dolić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cisplatin, platinum coordinated planar complex, is successful chemotherapeutic, used for the treatment of solid tumors. Binding of cisplatin to DNA results in the death of neoplasms, but application is limited by nephrotoxicity resulting in reduction or loss of kidney function. Of the numerous mechanisms that contribute to nephrotoxicity, oxidative stress is among the most pronounced. Iron is an essential element that the kidneys accumulate over time because it is not excreted. This increases the storage of iron in ferritin nanocages in the proximal tubules of the nephron and the risk of its release during cellular stress. How ferritin expression is altered by cisplatin treatment has been insufficiently investigated. The cells of the S3 section (*pars recta*) of the proximal tubules of the nephron in experimental animals experience the most damage. The aim of this work is to determine whether there is a change in the presence and distribution of both ferritin subunits in cisplatin-induced nephrotoxicity. After a single treatment with cisplatin (i.p. at a dose of 5 mg/kg), the nephrotoxic effect in male Wistar rats was expressed on the 5th day. Using specific antibodies, we monitored changes in the presence of light and heavy ferritin chains, which make up the nanocage, in archival samples of kidney tissue homogenates by western blot analysis. Using immunohistochemical analysis, we monitored their change in distribution on kidney tissue cryosections. We determined the change in the expression of nucleic acids using the end-point RT-PCR technique. An increase in the presence of light mRNA and light and heavy ferritin protein was found, as well as an increase and change in distribution, which indicates impaired ferritin metabolism as a possible cause of oxidative stress. The process probably starts from ferritinophagy, degradation in lysosomes, through the release of iron from ferritin to the iterative formation of hydroxide radicals, and further into ferroptosis. Control of the above, with a positive impact on the therapeutic function, is the desired outcome of this kind of results.

Keywords: autophagocytosis, ferritinophagy, lysosomes, transition metals, nanocage  
(62 pages, 20 figures, 1 table, 46 references, original in: croatian)

Mentor: dr. sc. Marija Ljubojević

Co-mentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Reviewers:

Thesis accepted:

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. BIOKEMIJA I FIZIOLOGIJA ŽELJEZA .....	2
1.1.2. Homeostaza željeza .....	3
1.1.3. Apsorpcija i recikliranje željeza .....	5
1.1.4. Željezo i oksidativni stres .....	6
1.1.5. Transport željeza u tkiva i organe .....	7
1.1.6. Prekomjerna ili nedostatna razina željeza u organizmu .....	9
1.1.7. Građa nefrona i fiziologija željeza u bubregu .....	11
1.1.8. FERITIN .....	11
1.1.9. Sturktura i <i>in vitro</i> uloga feritina.....	11
1.1.10. Ekspresija feritina .....	15
1.1.11. Uloga feritina u oksidativnom stresu i interakcija s drugim metalima ...	16
1.1.12. FEROPTOZA .....	17
1.1.13. Feritinofagija.....	19
1.2. CISPLATINA.....	21
1.2.1. Nakupljanje cisplatine u bubrežnim stanicama .....	22
1.2.2. Akutna ozljeda bubrega.....	23
1.2.3. Toksični učinci na bubreg izazvani liječenjem cisplatinom .....	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	24
3. MATERIJALI I METODE.....	25
3.1. OTOPINE I PUFERI .....	25
3.2. UREĐAJI, MATERIJALI I KEMIKALIJE .....	26
3.3. PROTUTIJELA.....	27
3.4. Priprema homogenata iz specifičnih regija bubrega.....	29
3.5. Kvantitativna analiza proteina.....	30

3.6.	Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i western blot metoda.....	30
3.7.	Denzitometrijska mjerenja .....	32
3.8.	Perfuzija i <i>in vivo</i> fiksacija tkiva .....	32
3.9.	Tkivne sekcije.....	32
3.10.	Indirektna imunofluorescencija .....	33
3.11.	Izolacija i ekstrakcija ukupne RNA iz tkivnih uzoraka .....	33
3.12.	Reverzna transkripcija (RT).....	34
3.13.	Polimerazom posredovana lančana reakcija (PCR) nakon RT (RT-PCR)....	35
3.14.	Statistička obrada i prikaz rezultata .....	36
4.	REZULTATI.....	36
4.1.	Rezultati western blot metode i ekspresije FtH i FtL u uzorcima homogenata bubrega.....	37
4.2.	Imunofluorescencijsko obojenje FtH i FtL na krio-sekcijama bubrega .....	39
4.3.	Rezultati RT-PCR analize semikvantifikacije mRNA FtH i FtL.....	44
5.	RASPRAVA.....	47
6.	ZAKLJUČAK .....	49
7.	LITERATURA.....	50
8.	ŽIVOTOPIS .....	

## KRATICE

AKI	akutno bubrežno zatajenje ( <i>engl.</i> acute kidney injury)
BSA	albumin iz goveđeg seruma ( <i>engl.</i> bovine serum albumin)
BFR	bakterioferitin ( <i>engl.</i> bacterioferritin)
CAT	katalaza ( <i>engl.</i> catalase)
CKD	kronična bolest bubrega ( <i>engl.</i> chronic kidney disease)
CP	ceruloplazmin ( <i>engl.</i> ceruloplasmin)
Ctr1	transporter bakra 1 ( <i>engl.</i> the copper transporter 1)
DAM-CY3	magareće protutijelo usmjereno protiv mišjeg IgG-a obilježeno obilježeno fluorescirajućom CY3 ( <i>engl.</i> donkey anti-mouse CY3)
DMT1	prijenosnik divalentnih metala 1 ( <i>engl.</i> divalent metal transporter 1)
FPN1	feroportin ( <i>engl.</i> ferroportin, solute carrier SLC40A1)
ER	endoplazmatski retikulum ( <i>engl.</i> endoplasmic reticulum)
ESRD	završni stadij bolesti bubrega ( <i>engl.</i> end-stage renal disease)
FDA	Agencija za hranu i lijekove ( <i>engl.</i> the Food and Drug Administration)
FtH	feritin teški lanac ( <i>engl.</i> feritin heavy chain)
FtL	feritin laki lanac ( <i>engl.</i> feritin light chain)
GAM-AP	kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno alkalnom fosfatazom ( <i>engl.</i> goat anti mouse alkaline phosphatase)
GGT	enzim gamma glutamil transpeptidaza ( <i>engl.</i> gamma-glutamyl transferase)
GPx	glutation peroksidaza ( <i>engl.</i> glutathione peroxidase)
GSH	glutation; tripeptidni stanični tiol (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinil-glicin)
HCP1	receptor za hem ( <i>engl.</i> heme carrier protein 1)
HIF	hipoksijom inducibilni faktor ( <i>engl.</i> hypoxia-inducible factor)
HP	Henleova petlja
IREB2	element odgovora na željezo ( <i>engl.</i> iron responsive elements)
IRP	protein odgovora na željezo ( <i>engl.</i> iron regulatory proteins)
LIP	labilni skup željeza ( <i>engl.</i> labile iron pool)
PBS	pufirirana fiziološka otopina ( <i>engl.</i> phosphate-buffered saline)
mRNA	glasničke RNA ( <i>engl.</i> messenger RNA)



NF- $\kappa$ B	transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B ( <i>engl.</i> nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NCOA4	koaktivator 4 nuklearnog receptora ( <i>engl.</i> nuclear receptor coactivator 4)
NFS1	cistein desulfuraza ( <i>engl.</i> cysteine desulfurase gene)
NTBI	netransferinski vezano željezo ( <i>engl.</i> non-transferin bound iron)
PCBP	proteini koji isporučuju željezo ( <i>engl.</i> poly(rC)-binding proteins)
PK	proksimalni kanalić nefrona
RME	receptorom posredovana endocitoza ( <i>engl.</i> receptor mediated endocytosis)
ROS	reaktivne kisikove vrste ( <i>engl.</i> reactive oxygen species)
SOD	superoksid dismutaza ( <i>engl.</i> superoxide dismutase)
STEAP	metaloreduktaza ( <i>engl.</i> six transmembrane epithelial antigen of prostate)
Tf	transferin
TfR1	transferinski receptor
TNF- $\alpha$	tumorski faktor nekroze $\alpha$ , ( <i>engl.</i> tumor necrosis factor $\alpha$ )
UTR	netranslatirana regija mRNA ( <i>engl.</i> untranslated region, UTR)
ZIP 14	prijenosnik cinka, SLC39A14 ( <i>engl.</i> Zrt (zinc-regulated transporters)/ Irt (iron regulated transporter)-like protein 14)
$\beta$ ME/bME	$\beta$ -merkaptoetanol ( <i>engl.</i> $\beta$ -mercaptoethanol)

# 1. UVOD

Željezo je esencijalni element u biologiji, potreban za brojne stanične procese. Ili previše ili premalo željeza može biti štetno, pa su svi organizmi razvili mehanizme za održavanje ravnoteže željeza. Kod sisavaca ne postoje kontrolirani mehanizmi za izlučivanje viška željeza, stoga je njegova homeostaza u tijelu regulirana na mjestima apsorpcije, korištenja i recikliranja (Wallace DF, 2016).

Sposobnost željeza da lako prolazi redoks ciklus između dva dominantna oksidacijska stanja,  $Fe^{+3}$  (feri) i  $Fe^{+2}$  (fero), temelj je njegovoj funkcionalnoj važnosti kao kofaktora potrebnog za aktivnost nekih od esencijalnih enzima i drugih molekularnih struktura. Željezo se često nalazi unutar funkcionalne hem skupine, sastavnice u lancu prijenosa elektrona, kao i hemoglobina koji prenosi kisik. Većina željeza u ljudskom tijelu (približno 65%) nalazi se unutar hemoglobina kojeg nose crvene krvne stanice (Wallace DF, 2016).

Feritin je poznat od 1937. godine, kada je prvi put pročišćen kristalizacijom iz kadmijevih soli, a smatra se jednim od glavnih proteina u metabolizmu željeza u organizmu. Obitelj feritina sastoji se od tri podfamilije: kanonski feritin sastavljen od 24 podjedinice (FTN), feritin koji sadrži heme, bakterioferitin (BFR) također sastavljen od 24 podjedinice i manji protein sa 12 podjedinica koji veže DNA bakterijske proteine koji pripadaju superfamiliji feritina (DPS). FTN je prototip feritina i nalazi se u bakterijama, biljkama i životinjama, dok su BFR i DPS ograničeni na prokariote. FTN uključuje klasični feritin teški-lanac (FtH) s ferooksidaznom aktivnošću, feritin laki-lanac (FtL) koji se nalazi samo u životinjama kao i rijedak mitohondrijski feritin FtMt (Arosio i sur., 2017).

Feritin je ključan protein za homeostazu željeza u tijelu, a njegove FtH i FtL podjedinice imaju specifične i komplementarne funkcije u skladištenju i regulaciji željeza. Razumijevanje ovih mehanizama ključno je za dijagnosticiranje i liječenje poremećaja vezanih uz metabolizam željeza.

Ferroptaza je nedavno opisani oblik programirane stanične smrti koji ovisi o željezu i lipidnoj peroksidaciji. Nađen mehanizam ferroptoze otvorio je nove puteve za istraživanja u kontekstu različitih bolesti, uključujući rak, neurodegenerativne bolesti i ishemijsko-reperfuzijske ozljede (Stockwell, 2022).

Nedavna istraživanja su pokazala da je poticanje ferroptoze obećavajući pristup za smanjenje otpornosti stanica raka na lijekove. U tom smjeru, cilj je inducirati ferroptozu u malignim stanicama, čime bi se povećala osjetljivost na neoplastične lijekove uključujući i cisplatinu (Liu i Wang, 2019). Cisplatin je jedan od najstarijih kemoterapeutika s metalnom jezgrom te je vrlo učinkovit antikancerogeni lijek koji se koristi pri tretmanu širokog spektra solidnih malignih bolesti, poput raka glave i vrata, pluća, testisa, jajnika, dojke i drugih. Međutim, njegova uporaba u kliničkoj praksi je ograničena zbog ozbiljnih nuspojava, posebno nefrotoksičnosti (Fang i sur., 2021).

## **1.1. BIOKEMIJA I FIZIOLOGIJA ŽELJEZA**

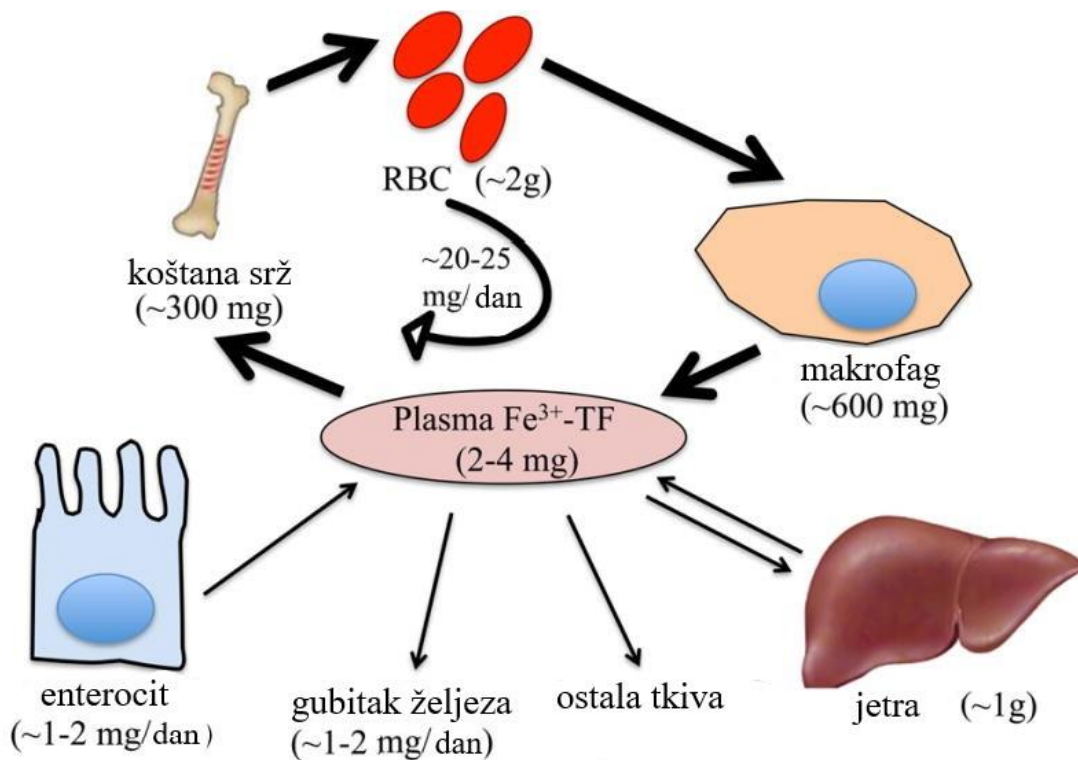
### **1.1.1. Osnovni oblici željeza u organizmu**

Željezo je obilan element na Zemlji i neophodna je komponenta svakog živog organizma. Međutim, unatoč svojoj geološkoj prisutnosti, željezo često predstavlja ograničavajući faktor rasta u okolišu. Ovaj očiti paradoks proizlazi iz činjenice da željezo u kontaktu s kisikom tvori željezo-oksidi koji su visoko netopljivi i stoga nije lako dostupan za preuzimanje od strane organizama. Kao evolucijski odgovor na to, razvili su se različiti stanični mehanizmi za hvatanje željeza iz okoline u biološki korisne oblike. Primjeri su siderofori koje izlučuju mikroorganizmi kako bi uhvatili željezo u vrlo specifičnom kompleksu ili pak mehanizmi za redukciju željeza iz netopljivog trovalentnog – feri oblika željeza ( $\text{Fe}^{+3}$ ) u topljivi dvovalentni oblik – fero oblik željeza ( $\text{Fe}^{+2}$ ), kao što je slučaj kod kvasca. Mnogi od mehanizama koji se nalaze u nižim organizmima imaju homologne prototipove u višim organizmima, uključujući ljude. U ljudskom tijelu, željezo uglavnom postoji u kompleksnim oblicima vezano za proteine (hemoproteine) kao što su spojevi hema (hemoglobin ili mioglobin), nadalje hem enzimi (citokromi) ili proteini bez hem prostetičke skupine kao flavin-željezni enzimi, izuzetno važna enzimska porodica ribonukleotid reduktaza (*engl.* ribonucleotide reductase, RNR), transferin i feritin. Tijelu je željezo neophodno za stalnu sintezu navedenih proteina posebno onih uključenih u prijenos kisika, hemoglobina i mioglobina (Abbaspour i sur., 2014).

### 1.1.2. Homeostaza željeza

Hepcidin je cirkulirajući peptidni hormon koji izlučuje jetra i igra centralnu ulogu u regulaciji homeostaze željeza. On je glavni regulator sustavne homeostaze željeza, te koordinira upotrebu i pohranu željeza s njegovim prikupljanjem (Abbaspour i sur., 2014). Hepcidin je peptid od 25 aminokiselina, koji se sintetizira i izlučuje iz hepatocita, nakon čega cirkulira plazmom i filtrira se putem bubrega. Hepcidin bazira svoje djelovanje kontrolom količine feroportina (FPN1) na membrani. Budući da je FPN1 jedini poznati protein koji izlučuje željezo u plazmu, interakcija hepcidina i feroportina ključna je za adekvatnu mobilizaciju odnosno otpuštanje željeza iz njegovih skladišta do tkiva i organa. Izravnim vezanjem hepcidina na FPN1 dolazi do njegove endocitoze i proteolize u lizosomima, što posljedično zaustavlja oslobađanje željeza iz stanica hepatocita. Pokazalo se kako je količina željeza u organizmu snažan regulator transkripcije hepcidina, iako se detalji točnog mehanizma još istražuju (Ganz, 2013). S obzirom na rijetkost biološki dostupnog željeza, sisavci učinkovito čuvaju i recikliraju željezo (Slika 1).

Željezo (Fe) cirkulira u krvi vezano za transferin (Tf). Većina željeza nalazi se u hemoglobinu crvenih krvnih stanica (~2 g željeza) i reciklira se u procesu eritrofagocitoze od strane retikuloendotelinih makrofaga. Makrofagi koji recikliraju željezo glavno su mjesto pohrane željeza uz jetrene hepatocitne stanice. Sve ostale stanice u tijelu sadrže manje količine željeza za esencijalne stanične procese. Željeza u cirkulaciji relativno je malo (2–4 mg) i mora se obnoviti svakih nekoliko sati kako bi se zadovoljila dnevna potreba za željezom te se pri tomu podržala eritropoeza i druge potrebe tijela (~20–25 mg). Otprilike 1–2 mg željeza dobiva se putem apsorpcije hrane u duodenumu, što je uravnoteženo nereguliranim gubitkom od 1–2 mg željeza, uglavnom kroz fiziološki gubitak epitela crijeva i kože te gubitak krvi. Izlučivanje željeza putem urina je minimalno, zbog višestrukih mehanizama za povrat željeza u bubregu, uglavnom proteinskog vezanog oblika cirkulirajućeg željeza za transferin. Budući da gubici željeza iz tijela nisu regulirani, glavne metode za regulaciju systemske ravnoteže željeza su kontrola apsorpcije željeza iz hrane i oslobađanje željeza iz reciklirajućih makrofaga i hepatocita (Dev i Babitt, 2017).



**Slika 1.** Mehanizmi koji reguliraju sustavnu homeostazu željeza (preuzeto i prilagođeno: Dev i Babitt, 2017).

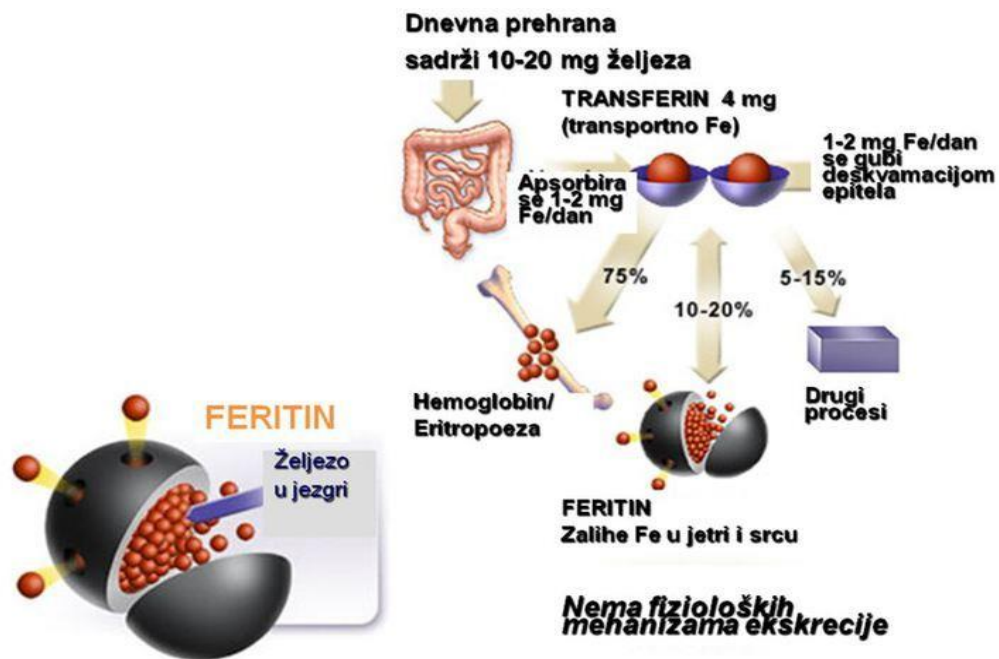
Glavni procesi regulacije sinteze proteina koji pak nadziru metabolizam željeza, na molekularnoj razini, su dalje opisani posttranskripcijski mehanizmi kojima se kontrolira stabilnost pojedinih mRNA. Željezom reguliran protein (IRP) veže se na specifične RNA sekvence nazvane željezom regulirani elementi (IRE) kako bi mu se odvijao dobro usklađen metabolizam. Ova interakcija omogućuje IRP-u kontrolu nad translacijom mRNA feritina i feroportina, te stabilnošću mRNA receptora za transferin (TfR). IRP-ovi, uključujući IRP1 i IRP2, su proteini vezanja za RNA koji mogu poticati ili inhibirati translaciju ovisno o dostupnosti željeza. Klasični IRE motiv, prisutan u 5' ili 3' ne-translatiranim regijama (UTR) ciljane mRNA, je konzervirana sekvenca od 30 nukleotida koja sadrži jezgru CAGUGN. Interakcije IRP-IRE igraju ključnu ulogu u održavanju stanične homeostaze željeza, te reguliraju ekspresiju prethodno navedenih proteina uključenih u unos, pohranu i otpuštanje željeza iz stanica (Xie i sur., 2024).

### 1.1.3. Apsorpcija i recikliranje željeza

Apsorpcija željeza odvija se u enterocitima pomoću dvovalentnog metalnog transportera 1 (DMT1), člana grupe membranskih transportnih proteina koji prenose endogene i egzogene tvari (Abbaspour i sur., 2014). Željezo koje apsorbiraju enterociti može se izravno koristiti za stanične metaboličke procese, pohraniti ili izlučiti preko bazolateralne membrane za sistemsku opskrbu. Željezo se pohranjuje u enterocitima, kao i u drugim stanicama, uglavnom u sferičnim nanokavezima feritina, građenih od već navedenih podjedinica teških (FtH) i lakih (FtL) lanaca oko unutrašnjosti ispunjene željezom koje je oksidirano pomoću FtH u feri-oblik (Arosio i sur., 2015). To omogućuje pohranu željeza u inertnom obliku koji ograničava proizvodnju štetnih redoks reaktivnih vrsta. Pohrana željeza u feritinu omogućuje kontroliranu dostavu željeza bazolateralnim prijenosnicima i sposobnost upravljanja sistemskom opskrbom željeza sa uračunatim gubitkom crijevnih stanica, koja se događa svakih nekoliko dana (Vanoaica i sur., 2010).

Apsorpcija se uglavnom odvija u dvanaesniku i gornjem jejunumu (Slika 2.). Oblik u kojem željezo ulazi u dvanaesnik uvelike utječe na njegovu bioraspoloživost. Pri fiziološkom pH, fero željezo ( $\text{Fe}^{+2}$ ) brzo se oksidira u netopivi feri ( $\text{Fe}^{+3}$ ) oblik. Želučana kiselina snižava pH u proksimalnom dvanaesniku, reducira  $\text{Fe}^{+3}$  u crijevnom lumenu pomoću feri reduktaza, što povećava topljivost i unos feri željeza i čime se omogućava naknadni transport  $\text{Fe}^{+2}$  preko apikalne membrane enterocita. Kada je proizvodnja želučane kiseline smanjena (na primjer, inhibitorima protonske pumpe kao što je lijek Prilosec), apsorpcija željeza je znatno smanjena (Pantopoulos i sur., 2012). Nadalje se željezo prenosi preko dvanaesničke sluznice enterocita u krv, gdje se transportira transferinom do stanica ili koštane srži za eritropoezu (proizvodnju crvenih krvnih stanica).

Postoji povratni mehanizam koji pojačava apsorpciju željeza kod osoba kojima željezo nedostaje. Nasuprot tome, osobe s viškom željeza smanjuju apsorpciju željeza putem hepcidina. Nakon što se željezo apsorbira, ne postoji fiziološki mehanizam za izlučivanje viška željeza iz tijela. Jedini fiziološki gubitak krvi je kod žena tijekom trudnoće zbog potreba i rasta ploda ili pri menstruaciji, a zatim drugu vrstu čine patološka krvarenja nakon unutarnjih i/ili vanjskih ozljeda (Abbaspour i sur., 2014).



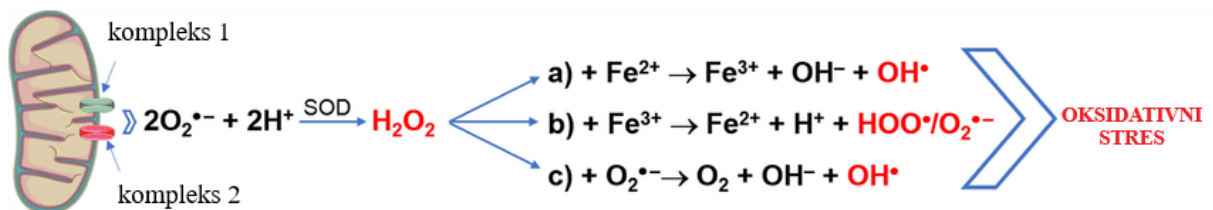
**Slika 2.** Željezo je vezano i transportirano u tijelu putem transferina i pohranjeno u molekulama feritina (preuzeto: PLIVAMED.net)

Sistemska isporuka željeza posredovana je bazolateralnim izvoznim proteinom feroportinom, FPN1. Feroportin, jedini poznati prijenosni protein željeza iz stanica u sisavaca, funkcionira i kao glavni čuvar kojim se kontrolira ulazak željeza u krvotok. Iako se molekularni mehanizmi izlaza željeza putem feroportina iz stanica još uvijek istražuju, smatra se da se željezo prenosi u obliku  $Fe^{+2}$ , te oksidira u  $Fe^{+3}$  s pomoću oksidaza koje imaju drugi reaktivni metal, bakar u katalitičkom centru: hefastina (*engl.* hephaestin) isključivo u gastrointestinalnom sustavu (GI) i ceruloplazmina (*engl.* ceruloplasmin, CP) na svim stanicama ponajviše na hepatocitima. Nadalje, feri-oblik se veže na transferin (Tf), glavni nosač željeza u plazmi. Transferin kroz cirkulaciju nosi 2 molekule željeza te održava željezo u redoks inertnom stanju.

Glavni izvor endogenog recikliranog željeza osiguravaju makrofagi. Specijalizirana populacija makrofaga fagocitira stare i oštećene crvene krvne stanice nakon prosječnog životnog vijeka od 120 dana. Crvene krvne stanice se nakon fagocitoze liziraju i razgrađuju u lizosomima, a željezo se oslobađa iz hemoglobina s pomoću hem oksigenaze-1. Željezo se tada i u makrofagima može pohraniti u feritinu i/ili isporučiti u krvotok putem feroportina (Dev i Babitt, 2017).

#### 1.1.4. Željezo i oksidativni stres

Najveća opasnost od slobodnog reduciranog željeza nastaje fiziološki u starim mitohondrijima gdje je oštećen kaskadni elektron transportni lanac (*engl.* electron transport chain, ETC) te je stalna produkcija vodikovog peroksida. Vodikov peroksid nastaje fiziološki dismutacijom kisikova radikala koji nastaje tijekom mitohondrijske respiracije, djelovanjem superoksid dismutaze (SOD) (He i Zhang 2016). Nakon odstranjenja mitohondrija mitofagijom dodatno još uz feritinoagiju, u lizosomskom kiselom mediju oslobođeni se fero ( $\text{Fe}^{+2}$ ) i feri ( $\text{Fe}^{+3}$ ) ioni uključuju u Fentonovu i Haber-Weissovu reakciju (Slika 3.) i reagiraju s vodikovim peroksidom proizvodeći visoko reaktivne hidroksilne ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), peroksi ( $\text{HOO}^{\bullet}$ ) i superoksidne ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) radikale.



**Slika 3.** Nastanak reaktivnih kisikovih vrsta putem Fentonove (a i b) i Haber-Weissove (c) reakcije (preuzeto i prilagođeno: <https://www.researchgate.net/>)

Ova ciklička reakcija katalizirana je i iterirana upravo velikim redoks potencijalom slobodnog željeza, a zbog njegove snažne reaktivnosti, vrlo malo povećanje količine slobodnog željeza u organizmu može dovesti do ponavljajuće reakcije stvaranja ROS (Bou Abdallah, 2010). Radi gore opisane moguće toksične uloge željeza, njegov sadržaj u stanici mora biti precizno reguliran kako bi se osigurale dovoljne količine za sve nužne procese, ali spriječile reakcije nastajanja radikala (Anderson i Frazer, 2017).

### 1.1.5. Transport željeza u tkiva i organe

Transport željeza u organizmu reguliran je složenim sustavom proteina koji osiguravaju njegovu apsorpciju, raspodjelu, metabolizam/skladištenje i ekskreciju (ADME) ali i ADMETox. Ključni proteini uključeni u ovaj proces su transferin (Tf), feritin, divalentni

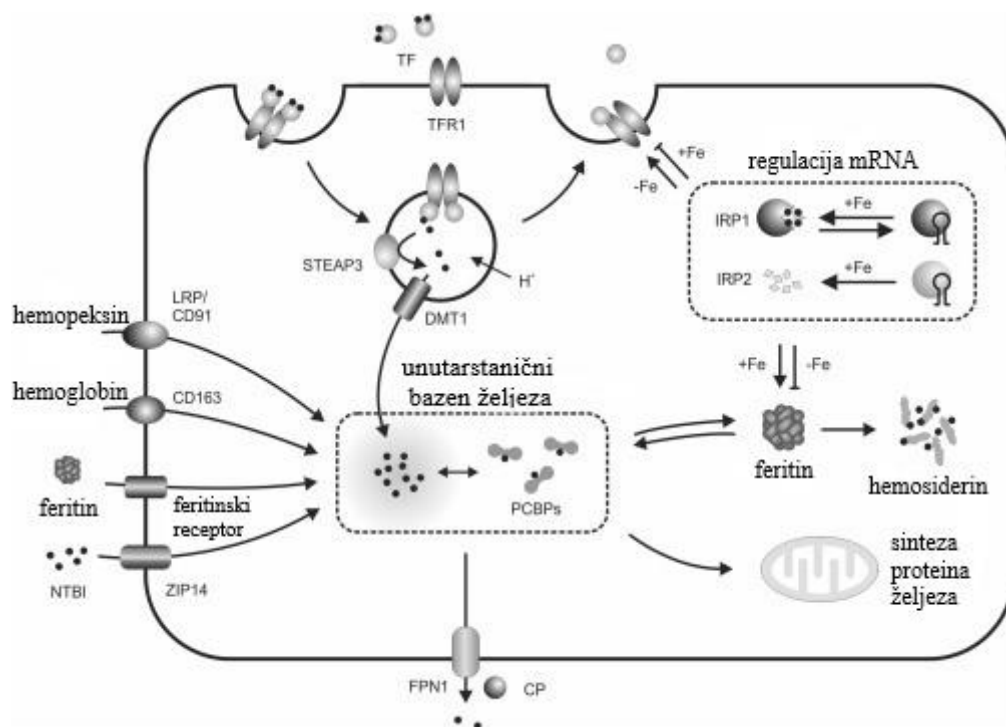


metalni transporter 1 (DMT1), heme oksigenaza 1 (HO-1) i šaperoni poput polipeptida vezanog za citokrom b (PCBP2) (Jiang i sur., 2015).

U cirkulaciju se, kako je već navedeno, iz stanice željezo otpušta u ( $\text{Fe}^{+2}$ ) fero-obliku putem FPN1, a u krvi, odnosno plazmi, se odmah veže kao  $\text{Fe}^{+3}$  na transferin zbog čega mora prethodno biti oksidirano putem hefestina ili ceruloplazmina. FPN1 je kod sisavaca dominantno eksprimiran u duodenalnim enterocitima, makrofagima i hepatocitima, odnosno stanicama koje održavaju koncentraciju željeza u plazmi (Muckenthaler i sur., 2017).

Transferin (Tf) je glikoprotein koji veže feri-oblik željeza ( $\text{Fe}^{+3}$ ) i transportira ga kroz krvotok. Željezo vezano za transferin (*engl.* transferrin bound iron, TBI) prenosi se do stanica i specifičnih transferinskih receptora (TfR) na staničnoj površini (Slika 4.). Kada se transferin veže za TfR, kompleks se receptor posredovanom endocitozom (RME) unosi u stanicu gdje se željezo oslobađa u endosomima. Unutar endosoma, željezo se reducira iz  $\text{Fe}^{+3}$  u  $\text{Fe}^{+2}$  oblik. Zakiseljavanje, acidifikacija endosoma, praćena redukcijom željeza od strane člana STEAP obitelji proteina, oslobađa željezo iz Tf, koje zatim prelazi preko endosomalne membrane putem DMT1 i ulazi u citoplazmu, omogućujući njegovu daljnju upotrebu ili skladištenje u proteinski kompleks feritin (Li i sur., 2017). Pri tom se u stanicu izlučuje slobodno ionsko reaktivno željezo, no precizan oblik ovog prijelaznog citosolnog bazena željeza (*engl.* labile iron pool, LIP) nije jasan, ali barem je dio tog željeza vezan za PCBP proteine koji djeluju kao njegovi šaperoni. Ovi kompleksi mogu isporučiti željezo novonastalim proteinima koji u strukturi sadrže željezo (iako nije jasno mogu li isporučiti željezo mitohondrijima) te proteinskom spremištu željeza, feritinu. Željezo koje prelazi potrebe stanice može se izvesti putem FPN1 uz prisutnost željezne oksidaze CP koja omogućava učinkovitost ovog procesa. Neke vrste stanica mogu preuzeti željezo u drugim oblicima, uključujući NTBI ili željezo koje se nalazi unutar feritina, hema ili hemoglobina. Stanični unos i pohrana željeza regulirani su i već opisanom posttranskripcijskim i sustavom IRE/IRP tako da niske koncentracije željeza favoriziraju sintezu više TfR1 i suzbijaju ekspresiju feritina, dok visoke stanične koncentracije željeza dovode do povećanja koncentracije feritina i smanjenja TfR1 (Slika 4.). Feritin pohranjuje višak željeza u netoksičnom obliku i oslobađa ga prema potrebi, čime se regulira unutarnja opskrba željezom i sprječava oksidativni stres. Hem oksigenaza 1 (HO-1) je enzim koji katalizira razgradnju hema u biliverdin, ugljični monoksid i fero željezo ( $\text{Fe}^{+2}$ ), pružajući dodatni izvor fero željeza za stanične potrebe. Polipeptid vezan za citokrom b (PCBP2) djeluje kao šaperon za fero željezo, osiguravajući njegov siguran transport unutar citosola i sprječavajući štetne učinke oksidativnog stresa (Ma i sur., 2018).

Regulacija ekspresije gore navedenih proteina te mehanizmi kontrole apsorpcije i raspodjele željeza ključni su za održavanje homeostaze željeza u organizmu.



**Slika 4.** Homeostaza željeza na razini stanice. Stanice mogu preuzeti željezo u raznim oblicima, ali sve stanice sa jezgrom imaju kapacitet koristiti željezo vezano za transferin (TF). TF veže se za TFR1 na plazmatskoj membrani, a kompleks se internalizira u endosome (detalji procesa opisani su u tekstu). \*CP, ceruloplazmin; DMT1, divalentni metal-ionski transporter 1; FPN1, ferroportin 1; IRP, regulatorni protein za željezo; LRP, LDL-receptor–povezani protein; mRNA, glasnička RNA; NTBI, ne–transferinom vezano željezo; PCBP, polinukleotid-vezujući protein; STEAP, 6-transmembranski epitelni antigen prostate; TF, transferin; TFR1, transferinski receptor 1; ZIP14, Zrt/Irt-slični protein (preuzeto i prilagođeno iz Anderson i Frazer, 2017.)

### 1.1.6. Prekomjerna ili nedostatna razina željeza u organizmu

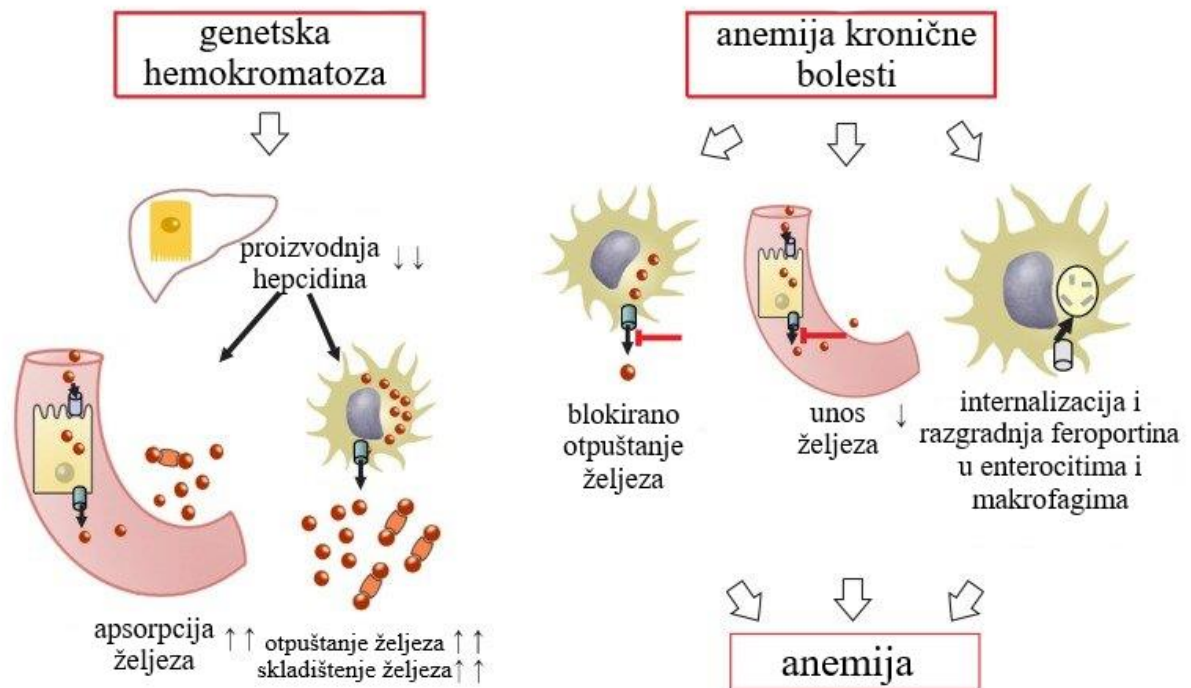
Većina primarnih preopterećenja organizma željezom ima genetsku osnovu. Primarni sindromi preopterećenja željezom, često nazivani hemokromatoza (Slika 5.), rezultat su

mutacija u genima koji su uključeni u transport željeza ili njegovu regulaciju. Nasuprot tome, sekundarno preopterećenje organizma željezom obično dolazi od transfuzija koje se koriste za liječenje određenih nasljednih poremećaja kao što su anemije s preopterećenjem željezom (npr.  $\beta$ -talasemija). Prepoznato je pet glavnih tipova hemokromatoze koje proizlaze iz mutacija u genima koji kodiraju sljedeće proteine: hemokromatozni protein (tip 1), hemojuvelin (tip 2A), hepcidin (tip 2B), Tfr2 (tip 3) i FPN1 (tip 4) (Anderson, 2007). Većina ovih stanja su rijetka, ali hemokromatoza povezana s hemokromatoznim proteinom relativno je česta u populacijama sjevernoeuropskog podrijetla (Barton i sur., 2015).

Liječenje preopterećenja organizma željezom ovisi o temeljnoj bolesti. Hemokromatoza se obično liječi vrlo učinkovitom i relativno jeftinom flebotomijom (Fleming i Ponka, 2012), uz uklanjanje oko 0,5 g Fe/L krvi. Nakon toga, željezo se mobilizira iz zaliha u jetri za eritropoezu kako bi se zamijenile uklonjene crvene krvne stanice. Kod anemija s preopterećenjem željezom, kao što su talasemije, flebotomija nije prikladna, pa se stoga željezo uklanja s pomoću lijekova koji vežu željezo, poznatih kao kelatori željeza (Olivieri i Brittenham, 2013).

S druge strane, nedostatak željeza uzrokuje anemiju (Slika 5.), stanje karakterizirano smanjenim brojem crvenih krvnih stanica ili hemoglobina, što dovodi do umora, slabosti i oslabljenog imunološkog sustava. Anemija opisuje stanje u kojem je broj crvenih krvnih stanica (*engl.* red blood cells, RBC) u krvi nizak ili krvne stanice imaju manje od normalne količine hemoglobina. Osoba koja ima anemiju naziva se anemičnom. Svrha crvenih krvnih stanica je dostaviti kisik iz pluća do drugih dijelova tijela. Željezo je vrlo važna komponenta hem prostetičke skupine u molekulama hemoglobina koji je funkcionalna jedinica crvenih krvnih stanica i kompleksna je proteinska struktura unutar crvenih krvnih stanica. Iako se crvene krvne stanice proizvode unutar koštane srži, mnogi drugi faktori su uključeni u njihovu proizvodnju. Na primjer, eritropoetin, molekula koju izlučuju bubrezi, nakon akutne ili kronične hipoksije koja se registrira u bubrežnom intersticiju, potiče stvaranje crvenih krvnih stanica u koštanoj srži.

Ispravan broj crvenih krvnih stanica i prevencija anemije odraz su suradnje između bubrega, koštane srži i raspoloživih hranjivih tvari i elemenata unutar tijela. Ako bubrezi ili koštana srž ne funkcioniraju ispravno ili je tijelo loše hranjeno, tada normalan broj crvenih krvnih stanica i njihova funkcija mogu biti teško održavane.



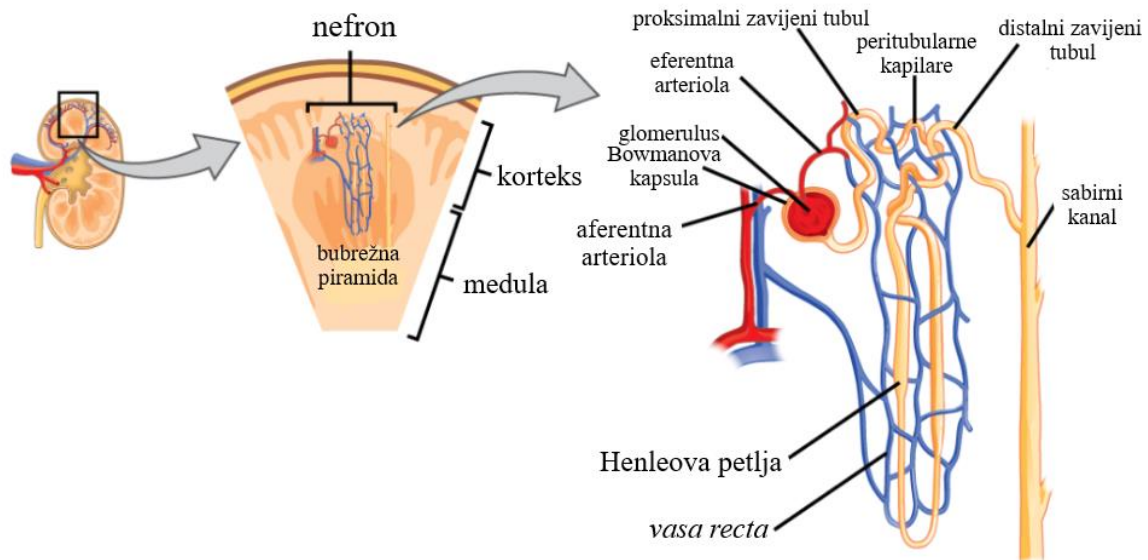
**Slika 5.** Patofiziologija kronične bolesti hemokromatoze i anemije (preuzeto i prilagođeno: <https://www.researchgate.net/>)

### 1.1.7. Građa nefrona i fiziologija željeza u bubregu

Nefron (Slika 6.) je osnovna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega, sastavljena od glomerula i tubularnog sustava. Glomerul je mreža krvnih kapilara smještena unutar Bowmanove kapsule, koja služi kao početni dio filtracije krvi. Nakon filtracije, filtrat ulazi u tubularni sustav odnosno sustav kanalića, koji se sastoji od proksimalnih kanalića, Henleove petlje, distalnih kanalića i sabirnog kanalića.

Proksimalni kanalić je prvi dio tubularnog sustava i ima visoku apsorpcijsku sposobnost za vodu, elektrolite i druge endogene i egzogene tvari iz filtrata. Henleova petlja, koja se sastoji od silaznog i uzlaznog dijela, omogućuje koncentraciju mokraće putem reapsorpcije vode i elektrolita. Distalni kanalić regulira kiselost i koncentraciju iona u filtratu, dok sakupljački, sabirni kanalić konačno regulira koncentraciju mokraće odnosno vodu u njoj prije nego što se izluči iz bubrega.

Ova složena struktura nefrona omogućuje bubrezima održavanje homeostaze u organizmu filtracijom krvi, reapsorpcijom korisnih tvari i izlučivanjem otpadnih produkata.



**Slika 6.** Građa nefrona, funkcionalne jedinice bubrega (preuzeto i prilagođeno: <https://www.researchgate.net/>)

Proces prolaska mokraće kroz bubrege, podrazumijeva niz složenih fizioloških mehanizama pri čemu nastaje urin. Počinje filtracijom krvi kroz glomerularnu barijeru, koja se sastoji od glomerularnog endotela, bazalne membrane i cjedila formiranog specifičnom građom podocita, specifičnog epitela glomerula, što omogućuje selektivnu prohodnost za komponente plazme, vodu, elektrolite i druge tvari. Nakon filtracije, formira se primarni urin, koji prolazi kroz tubularni sustav bubrega gdje se reapsorbiraju korisne tvari, prema potrebi voda i elektroliti, te sva glukoza natrag u krvotok. Taj proces reapsorpcije uglavnom se odvija u proksimalnom tubulu i Henleovoj petlji, čime se koncentrira filtrat i minimizira gubitak korisnih tvari. Nepotrebni i otpadni produkti ostaju u tubularnom filtratu te prolaze kroz distalni kanalić i sakupljački, sabirni kanalić, gdje se dodatno regulira kiselost i koncentracija iona prije nego što se formira konačni urin. Konačni urin se prikuplja u bubregu i prenosi iz bubrega u mjehur putem uretera, gdje se skladišti prije izlučivanja iz tijela. Ovaj proces kontinuirane filtracije i reapsorpcije osigurava prije spomenuto očuvanje homeostaze tjelesnih tekućina uz održavanje elektrolita, volumena krvi i kiselo-bazne ravnoteže u tijelu. (Guyton i Hall, 2011).

Fiziologija željeza u bubrezima uključuje složene procese apsorpcije, transporta i regulacije ovog esencijalnog metala. Željezo, vezano većinom za Tf se sa svim komponentama plazme filtrira kroz glomerularnu barijeru, pa se većina filtriranog željeza reapsorbira u proksimalnim kanalićima bubrega već opisanim prijenosnim mehanizmima RME TfR1. Ovaj proces omogućuje bubrezima da održe homeostazu željeza u tijelu. Regulacija željeza u bubrezima također uključuje sintezu hormona eritropoetina (EPO) koji potiče proizvodnju crvenih krvnih stanica u koštanoj srži, te igra ključnu ulogu u održavanju ravnoteže željeza u tijelu putem stimulacije eritropoeze (Xie i sur. 2024).

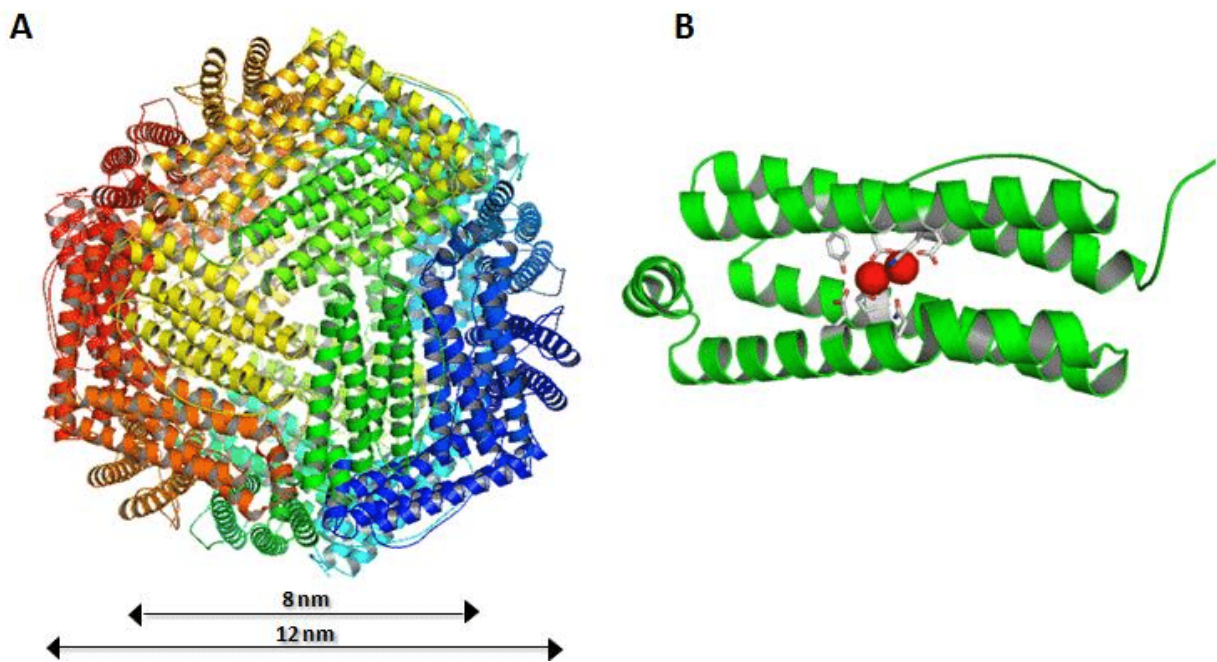
### **1.1.8. FERITIN**

Feritin je glavni skladišni protein željeza. Gotovo je sveprisutan i strogo reguliran od strane ovog metala. Biokemijska i strukturna svojstva feritina su uvelike očuvani od bakterija do čovjeka, iako se uloga u regulaciji prometa željeza razlikuje kod različitih organizama. Nedavne studije razjasnile su neke od glavnih aspekata reakcije između željeza i feritina, što rezultira formiranjem jezgre željeza i proizvodnjom vodikovog peroksida. Karakterizacija staničnih modela u kojima je ekspresija feritina modulirana pokazala je da katalitičko mjesto feroksidaze na teškom lancu feritina (FtH) ima središnju ulogu u regulaciji dostupnosti željeza. Zauzvrat, to ima sekundarne učinke na brojne stanične aktivnosti, uključujući proliferaciju i otpornost na oksidativna oštećenja. Nadalje, odgovor na apoptotičke podražaje je pod utjecajem ekspresije FtH. Promijenjena ekspresija lakog lanca feritina (FtL) pronađena je u najmanje dvije vrste genetskih poremećaja, iako njegova uloga u patologiji nije potpuno razjašnjena. Nedavno otkriće novog feritina specifičnog za mitohondrije, koji je funkcionalno sličan FtH, otvara nove perspektive u proučavanju odnosa između feritina, željeza i oksidativnih oštećenja slobodnim radikalima (Arosio i Levi, 2010).

### **1.1.9. Struktura i *in vitro* uloga feritina**

Feritin je sferični protein sastavljen kao kugla od podjedinica za pohranu do nekoliko tisuća atoma željeza. Feritini su nastali rano u filogenezi i prisutni su u arheobakterijama, eubakterijama, biljkama, beskralježnjacima i sisavcima. Geni za feritin prisutni su, često u više

kopija, u većini organizama, s izuzetkom kvasca, koji koristi alternativne mehanizme pohrane viška željeza. Iako feritini različitog podrijetla mogu imati znatno različite sekvence, s identitetima niskim i do 15%, njihove trodimenzionalne strukture su izuzetno visoko očuvane. Dvadeset četiri podjedinice okupljaju se u velike, vrlo stabilne sferične komplekse s 2,3,4 točkastom simetrijom (Slika 7.A). Peptidni lanac podjedinice savija se u četiri snopa alfa-uzvojnice s dugom petljom između dva snopa, te petom kratkom alfa-uzvojnicom na C-kraju (Slika 7.B) (Harrison i Arosio, 1996a).



**Slika 7.** Shema prikaza sastavljenog 24-mernoga proteina (A) prikazana niz os trostruke simetrije kako bi se vidio hidrofилni kanal uključen u izmjenu željeza, i struktura podjedinice ljudskog teškog lanca feritina (B) (preuzeto i prilagođeno: <https://www.researchgate.net/>)

Svi feritini imaju svojstvo lakog stupanja u interakciju s ionima  $\text{Fe}^{+2}$  u otopini pod aerobnim uvjetima te neki induciraju oksidaciju i nakupljanje željeza unutar šupljine (Harrison i Arosio, 1996a). U osnovi, reakcija sa željezom započinje vezanjem Fe na specifično mjesto nazvano feroksidazni centar. Željezo stupa u interakciju s kisikom, oksidira se u  $\text{Fe}^{+3}$  te zatim migrira u šupljinu gdje se agregira. U *in vitro* reakcijama, korak oksidacije je brz, dovršava se u nekoliko sekundi, dok je korak hidrolize-mineralizacije, koji određuje obnavljanje feroksidaznog centra, sporiji i dovršava se u nekoliko minuta. Sedam aminokiselinskih ostataka

koji doprinose formiranju feroksidaznog mjesta su očuvani u svim feritinima. Kod sisavaca se teške (FtH) podjedinice s feroksidaznom aktivnošću zajednički sastavljaju s lakim (FtL) tipom, tvoreći heteropolimere koji su učinkovitiji za inkorporaciju i mineralizaciju željeza. Mitohondrijski feritini nalaze se kod sisavaca i insekata i karakterizirani su sintezom kao prekursori s mitohondrijskom ciljanom sekvencom koja se uklanja u zreom proteinu (Arosio i Levi, 2010). Međutim, postoje razlike u mehanizmima oksidacije željeza kod različitih feritina. Na primjer, FTN feritin iz *E. coli* oksidira željezo sporije u reakciji koja proizvodi vodu, dok ljudski FtH oksidira željezo brže u reakciji koja proizvodi vodikov peroksid. Stvaranje ovog produkta u blizini željeza potencijalno je štetno jer može inicirati već opisanu Fentonovu reakciju (Slika 3.), što također može biti relevantno za oštećenja proteina i formiranje hemosiderina, pretpostavljenog netopljivog produkta razgradnje feritina (Santambrogio i sur., 1992).

FTN-i biljaka ili fitoferitini izraženi su u plastidima i karakterizirani su N-terminalnim produžetkom peptida koji se nalazi na vanjskoj površini proteina i djeluje kao drugi feroksidazni centar za vezanje i oksidaciju željeza te regulira oslobađanje željeza tijekom klijanja i ranog rasta sadnica. Feroksidazni centar je homologan onome koji se nalazi u FtH sisavaca.

Feritin prokariota ima sličnu strukturu eukariotskom feritinu, a feroksidazni centar je također očuvan te djeluje kao pravi katalitički centar za oksidaciju željeza u šupljini, ali ima dodatno unutarnje mjesto vezanja željeza nazvano mjesto C koje usporava mineralizaciju željeza i feroksidazu.

Općenito, feritini su regulirani željezom i oksidativnim stresom, što sugerira da je njihova glavna funkcija suočavanje sa željezom i reaktivnim kisikovim spojevima (ROS). Međutim, mehanizmi njihove regulacije variraju među različitim kraljevstvima: u prokariotima i biljkama kontrola se odvija na translacijskom nivou, dok se kod životinja većina regulacije ovisne o željezu odvija na posttranskripcijskom nivou putem već opisanih IRE/IRP mehanizma (He i sur., 2016).

#### **1.1.10. Ekspresija feritina**

Regulacija ekspresije feritina je već opisani gore navedeni i najbolje istraženi posttranskripcijski sustav, željezom ovisan mehanizam interakcije između IRP i IRE (Hentze i



Kuhn, 1996). Taj je sustav osjetljiv ne samo na dostupnost željeza, već i na oksidativni status stanice, te slično regulira FtH i FtL koji imaju gotovo identične IRE sekvence.

U mnogim aspektima, feritin se smatra i članom skupine proteina koji reagiraju na stres i upalu. Upalni citokini, posebice tumorski faktor nekroze  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) i interleukin-2 (IL-2), povećavaju sintezu feritina u različitim staničnim linijama sisavaca, uključujući mezenhimalne stanice, hepatocite i monocitne makrofage (Miller i Schumaker, 1991). Regulacijski element za ovaj odgovor, specifičan za FtH i nazvan FER2, smješten je 4.8 kbp uzvodno od početka transkripcije u mišjem genu FtH i uključuje vezno mjesto za transkripcijski faktor NF $\kappa$ B (Kwak i sur., 1995).

### **1.1.11. Uloga feritina u oksidativnom stresu i interakcija s drugim metalima**

Ekspresija feritina modulira se različitim uvjetima povezanim s oksidativnim stresom koji djeluju izravno na ekspresiju gena ili neizravno putem modifikacije aktivnosti IRP-a. Pretpostavlja se da ovaj protein igra ulogu u zaštiti od oksidativnih oštećenja što je i potvrđeno eksperimentima u kojima su endotelne stanice prvo bile izložene akutnom stresu željezom, a zatim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i hemu (He i Zhang 2016). Predtretman je zaštitio stanice od oksidativnih oštećenja i sugerirano je da feritin ima zaštitnu ulogu. Slični rezultati dobiveni su s mišjim i ljudskim leukemijskim stanicama koristeći različite vrste oksidativnih oštećenja. Također, stanice obogaćene apoferitinom putem pinocitnog unosa pokazale su povećanje otpornosti na oksidativni stres, dok je umjetno smanjenje sadržaja FtH korištenjem antisense oligonukleotida smanjilo otpornost na stres. Pretretman ultraljubičastim A zračenjem (UVA), koje je povećalo ekspresiju hemoksigenaze, također je imao zaštitne učinke protiv oksidativnih oštećenja (Bou-Abdallah, 2010; Xie i sur. 2024).

Feritin dakle, može smanjiti oksidativni stres vezujući višak željeza, prvenstveno je poznat po svojoj ulozi u skladištenju željeza i detoksikaciji, ali također stupa u interakciju s drugim metalima, utječući na staničnu homeostazu metala. Pokazano je da feritin može sekvestrirati različite metalne ione, uključujući cink, aluminij i berilij, premda se afinitet i kapacitet za ove metale razlikuju (Smith i sur., 2006; Kim i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da cink može zamijeniti željezo u jezgri feritina, što može utjecati na strukturnu cjelovitost i funkciju feritina. Dodatno, opažena je interakcija feritina s bakrom, pri čemu bakreni ioni mogu katalizirati

oksidativne modifikacije feritina, utječući na njegovu sposobnost skladištenja željeza (Harrison i Arosio, 1996b; Bou-Abdallah, 2010; Kondaiah i sur., 2019). Ove interakcije naglašavaju širu ulogu feritina u metabolizmu metala i njegov širi potencijalni utjecaj na oksidativni stres i stanično zdravlje (Arosio i Levi, 2010).

### **1.1.12. FEROPTOZA**

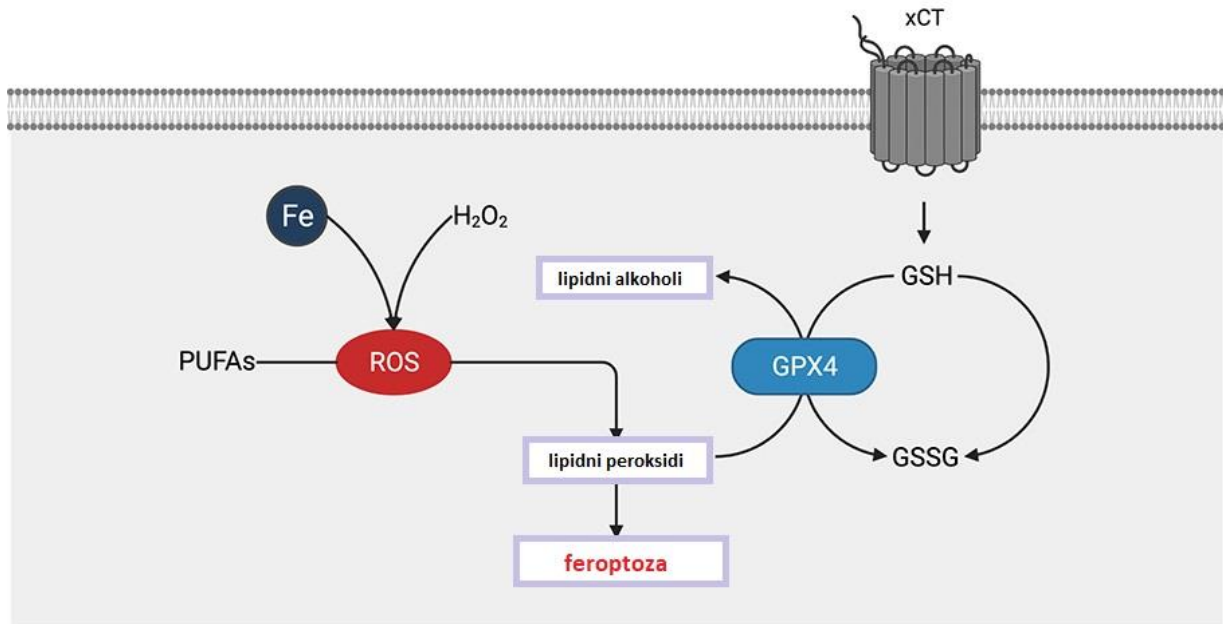
Smrt je dio prirodnog procesa svih živih bića, uključujući pojedinačne stanice. Ovaj proces može se dogoditi na različite načine, a novi putovi stanične smrti nastavljaju se otkrivati. Jedan od njih, nazvan ferroptaza, prvi put je opisan 2012. godine kao neapoptični, o željezu ovisan oblik programirane stanične smrti (Dixon i sur., 2012).

Ova vrsta stanične smrti ne dijeli klasične značajke apoptoze poput aktivacije kaspaza i fragmentacije kromatina nego je ovisna o željezu, smanjenom unosu cisteina (sistem xC-) i sintezi glutatona (GSH), te stvaranju, do smrtonosnih razina, lipidnih peroksida koje glutathion peroksidaza 4 (Gpx4) ne može procesirati (Slika 8.). Također, stanice koje prolaze kroz ferroptozu pokazuju posebne morfološke karakteristike poput smanjenih i oštećenih mitohondrija (Li i sur., 2020).

Smrt stanica koja se događa isključivo putem ferroptoze može se suzbiti kelatorima željeza, lipofilnim antioksidansima, inhibitorima lipidne peroksidacije i iscrpljenjem polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), te neposredno korelira s nakupljanjem markera lipidne peroksidacije kao malondialdehida (MDA) ili 4-hidroksinoneala (4HNA) (Liu i Wang, 2019).

Osjetljivost na ferroptozu usko je povezana s brojnim biološkim procesima, uključujući metabolizam aminokiselina, željeza i polinezasićenih masnih kiselina te biosintezu glutatona, fosfolipida, NADPH i koenzima Q10. Ferroptaza je od nedavno povezana s patološkom staničnom smrću u degenerativnim bolestima (npr. Alzheimerova, Huntingtonova i Parkinsonova bolest), karcinogenezi, moždanom udaru, intracerebralnom krvarenju, traumatskoj ozljedi mozga, ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi i degeneraciji bubrega kod sisavaca te je također implicirana u toplinskom stresu kod biljaka. Ferroptaza kroz funkciju

supresora tumora mogla bi se iskoristiti i za terapiju raka (Stockwell, 2022).



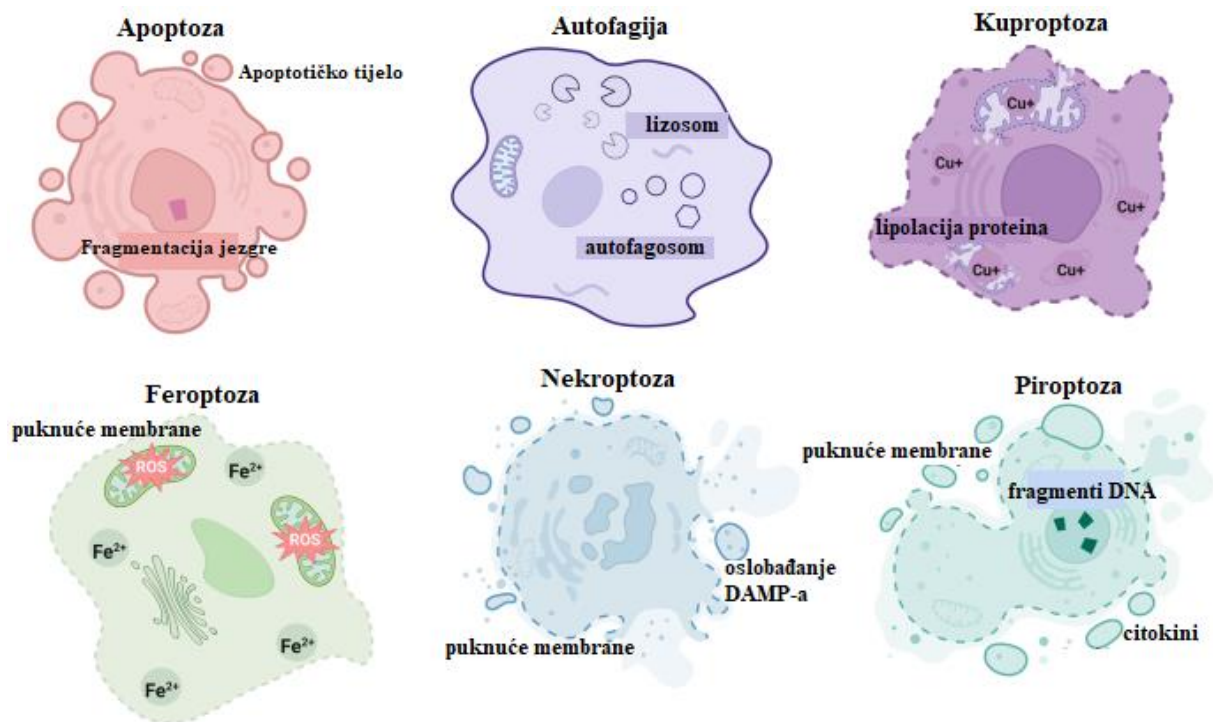
**Slika 8.** Kaskadna reakcija ferroptoze. Proteini koji reguliraju ferroptozu su glutation peroksidaza 4 (GPX4) ključni je enzim u ovom putu. GPX4 učinkovito inhibira ferroptozu ograničavajući lipidne perokside generirane od strane reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Ovaj proces zahtijeva glutation (GSH), čija je sinteza ograničena unosom cisteina koji pak osigurava prijenosnik xCT (dio sistema xC-) (Liu i Wang, 2019.)

Ferroptozu može nastati na dva načina, putem, ekstrinzičnog ili puta ovisnog o transporterima (npr. SLC7A11, SLC38A1, NOXs i TFRC) te unutarnjeg ili enzimom reguliranog puta (npr. ACSL4, ALOXs, GPX4, POR, GCH1, NOS i AIFM2). Ferroptozu je uzrokovana neravnotežom redoks procesa između proizvodnje oksidansa i antioksidansa, što je potaknuto abnormalnom ekspresijom i aktivnošću više redoks aktivnih enzima koji proizvode ili detoksificiraju slobodne radikale i proizvode oksidacije lipida. Konačno, ferroptozu je precizno regulirana na više razina, uključujući epigenetičke, transkripcijske, posttranskripcijske i posttranslacijske slojeve. Transkripcijski faktor NFE2L2 igra centralnu ulogu u regulaciji obrane od ferroptoze, dok selektivna autofagija može poticati smrt feropozom (Stockwell, 2022).

Nekoliko studija pokazalo je da regulacija stanične smrti feropozom uključuje gene povezane metabolizmom željeza, poput transferina, nitrogen fiksacije 1 (NFS1), proteina koji veže IRE 2 (IREB2), nuklearnog koaktivatora receptora 4 (NCOA4), itd.

Smrt stanice feropozom (Slika 9.) popraćena je nizom promjena u morfologiji stanica, metabolizmu i ekspresiji proteina, što omogućuje razlikovanje od drugih oblika stanične smrti.

Na celularnoj i subcelularnoj razini, stanice koje prolaze kroz ferroptozu usvajaju karakterističan zaobljeni oblik prije stanične smrti, sličan nekrotičnim stanicama, ali nema bubrenja citoplazme i organela niti pucanja plazma membrane (Dixon i sur., 2012).



**Slika 9.** Prikaz stanične smrti ferroptozom (preuzeto i prilagođeno: Chen i sur., 2023)

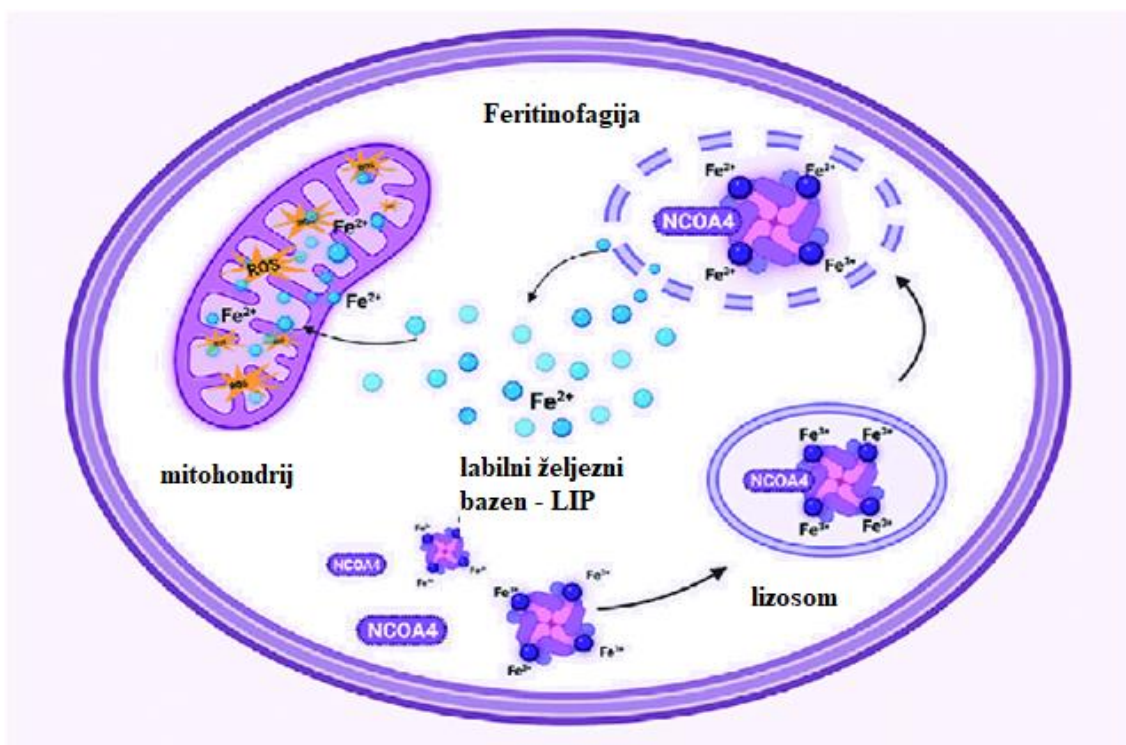
Ježgre stanica u ferroptozu zadržavaju svoju strukturalnu cjelovitost, bez kondenzacije, marginalizacije kromatina, stvaranja vezikula na plazma membrani ili formiranja apoptočnih tijela, što su karakteristične značajke apoptoze. Također, morfološke značajke poput dvostrukomembranskih vezikula koje okružuju autofagocitotne stanice i intenzivne vezikule te gubitak cjelovitosti plazma membrane prisutne kod piroptoze, nisu uočene u ferroptotičnim stanicama. Jedina prepoznatljiva morfološka značajka su mitohondriji koji se čine manjima nego obično s povećanom gustoćom membrane (Dixon i sur., 2012).

### 1.1.13. Feritinofagija

Feritinofagija (Slika 10.) proces je autofagije/autofagocitoze koji igra ključnu ulogu u regulaciji homeostaze željeza u stanicama. Centralnu ulogu u ovom procesu ima nuklearni receptorski koaktivator 4 (NCOA4), koji djeluje kao posrednik u selektivnoj degradaciji feritina unutar autofagosoma. Feritin se ciljano razgrađuje pod utjecajem NCOA4, što rezultira oslobađanjem bioreaktivnog/raspoloživog željeza unutar staničnog okoliša (Biasiotto i sur., 2016).

Ova regulacija između skladištenja i oslobađanja željeza važna je za brojne procese staničnog metabolizma. Osim što osigurava stanicama potrebne razine željeza za metaboličke procese poput sinteze hemoglobina i staničnog disanja, regulacija feritinofagije ima posljedice na stanični stres i preživljavanje. Naime, kako je već više puta rečeno, nakupljanje slobodnog željeza unutar stanica može potaknuti Fenton reakciju, koja generira reaktivne kisikove vrste (ROS) i rezultira oksidativnim stresom.

Moguća uloga feritinofagije u patofiziologiji bolesti, posebno u kontekstu karcinoma, pruža značajnu motivaciju za daljnje istraživanje i potencijalno razvoj novih terapijskih strategija (Biasiotto i sur., 2016; Li i sur., 2020).

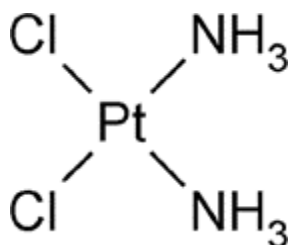


**Slika 10.** Proces feritinofagije (preuzeto i prilagođeno: <https://www.researchgate.net/>)

## 1.2. CISPLATINA

Cisplatina, spoj cis-diaminodikloroplatina (II), dobro je poznati planarni, metalo-anorganski kemoterapijski lijek (Slika 11.). Koristi se za liječenje brojnih solidnih karcinoma, uključujući karcinom mjehura, glave i vrata, pluća, jajnika i testisa, te limfome i sarkome. Mehanizam djelovanja cisplatine povezan je s njegovom sposobnošću stvaranja unakrsnih unutar- i među-lančanih veza s purinskim bazama na DNA, uzrokujući oštećenje DNA i ometajući mehanizme popravka DNA, uz posljedičnu indukciju apoptoze u stanicama raka. Međutim, zbog nastanka otpornosti na lijek i brojnih neželjenih nuspojava poput nefrotoksičnosti i teških problema s bubrezima, smanjenja imuniteta na infekcije, gastrointestinalnih poremećaja, krvarenja te gubitka sluha, posebno kod mlađih pacijenata, koriste se i drugi lijekovi koji sadrže platinu, poput karboplatine, oksaliplatine i drugih (Dasari i Tchounwou, 2014).

Cisplatina je koordinacijski spoj s platinom u centru kvadratno planarne simetrijom. To je duboko žuti do žuto-narančasti kristalni prah pri sobnoj temperaturi. Djelomično je topljiv u vodi i topljiv u dimetilformamidu i N,N-dimetilformamidu. Cisplatina je stabilna pri normalnim temperaturama i tlakovima, ali se može polagano transformirati tijekom vremena u trans-izomer (Dasari i Tchounwou, 2014).



**Slika 11.** Kemijska struktura planarne molekule cisplatine

Cisplatina i njena citotoksična svojstva otkrivena su slučajno 1960-ih godina, a do kraja 1970-ih godina stekla je status ključnog sastojka u sistemskom liječenju tumora germinalnih stanica testisa. Bio je prvi spoj s platinom odobren od strane FDA-e za liječenje karcinoma 1978. godine (Kelland, 2007), što je potaknulo interes za spojevima koji sadrže platinu (II) i druge metale kao potencijalne antikancerogene lijekove (Zhang i sur., 2022). U današnje vrijeme nalazi se u mnogim „koktelima“ kemoterapijskih lijekova koji su još uvijek u širokoj primjeni prilikom liječenja solidnih karcinoma.

Također su istraživanja pokazala da je cisplatina, kao i većina spojeva koji sadržavaju prijenosne metale, zaslužna za stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species, ROS), koji utječu na tumor supresor protein p53, izazivaju apoptozu preko interakcije receptora smrti sa tumorskim faktorom nekroze, (*engl.* tumor necrosis factor, TNF) i intrinzičnim kaspazama, izaziva mitohondrijsku disfunkciju. Nadalje, cisplatina također utječe na signalizaciju putem kalcija u stanici pri čemu se stvara stres endoplazmatskog retikuluma (*engl.* endoplasmic reticulum, ER). Navedeni su samo neki od mehanizama kojim cisplatina narušava homeostazu normalnih i neoplastičnih stanica. Navedeno djelovanje cisplatine u svim stanicama ima ulogu i u nefrotoksičnosti. Poznato je da uzrokuje oštećenja specifičnih kanalića, a uz to i upalne procese u intersticiju te oštećenja endotela krvnih žila i kapilara (Manohar i Leung, 2017; Volarevic i sur., 2019).

### **1.2.1. Nakupljanje cisplatine u bubrežnim stanicama**

Cisplatina se najviše izlučuje iz organizma putem bubrega korištenjem dvaju glavnih mehanizama: glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom. Koncentracija cisplatine u bubrežima je viša nego u krvi, što sugerira da dolazi do nakupljanja u stanicama bubrežnog parenhima, s dominantnim nakupljanjem u kortikalnom dijelu, iako se u manjoj mjeri akumulira i u srži (Ljubojević 2003; Miller i sur., 2010). Ranija istraživanja na bubrežnim narezcima, primarnim i sekundarnim kulturama renalnih stanica i izoliranim prokrvljenim segmentima proksimalnih kanalića (PK) ukazuju na postojanje bazolateralno-apikalnog transporta cisplatine. Pritom su otkrivena dva membranska transportera koja omogućuju unos cisplatine u stanicu sekrecijom: transporter bakra 1 (Ctr1) i organski kationski transporter 2 (OCT2) (Miller i sur., 2010; Manohar i Leung, 2017; Volarevic i sur., 2019). Ctr1 je visoko eksprimiran u bubrežima odraslih osoba i lociran na bazolateralnoj membrani PK. Smanjena ekspresija Ctr1 u bubrežima u *in vitro* uvjetima smanjuje unos cisplatine i smanjuje njegovu citotoksičnost, što ukazuje na ključnu ulogu ovog transportera za unos cisplatine. Drugi transporter, OCT2, također se nalazi na bazolateralnoj membrani stanica PK. Dokazano je da cisplatina ometa unos drugih spojeva putem ovog transportera. Knock-out OCT2 gena rezultira značajnim smanjenjem izlučivanja cisplatine urinom i nefrotoksičnosti (Miller i sur., 2010).

Pri ulasku u stanice bubrežnih kanalića, kao dio filtrata cisplatina prolazi kroz niz biokemijskih reakcija koje dodatno pojačavaju njenu toksičnost. Ovaj proces započinje formiranjem glutathion konjugata u cirkulaciji, što je vjerojatno posredovano glutathion-S-transferazom. Kada ti

konjugati prolaze kroz nefrone, enzim gamma glutamil transpeptidaza (GGT), koji se nalazi na površini stanica PK, cijepa ih na cisteinil-glicin-konjugate. Ti se konjugati potom metaboliziraju aminopeptidazama u cistein-konjugate. Cistein-konjugati se zatim transportiraju u stanice PK putem aminokiselinskih transportera na apikalnoj membrani, gdje se dodatno metaboliziraju enzimom cistein-S-konjugat beta-lizatom u visoko reaktivne tiole, organske spojeve koji sadrže -SH skupinu vezanu za atom ugljika (Miller i sur., 2010). Cisplatina tako u stanice može ući neposredno sekrecijom putem već navedenih Ctr1 i OCT2 transportera na bazolateralnoj membrani i nakon filtracije gore navedenim procesom ulaza na apikalnoj strani epitelnih stanica nefrona PK (Miller i sur., 2010; Manohar i Leung, 2017; Volarevic i sur., 2019).

### **1.2.2. Akutna ozljeda bubrega**

Akutna ozljeda bubrega (*engl.* acute kidney injury, AKI ) definira se kao klinički sindrom koji se karakterizira brzim smanjenjem bubrežne funkcije, uz nakupljanje otpadnih tvari u organizmu kao što je ureja. AKI nastaje kao posljedica nekih bolesti, infekcija, lijekova i traumatskih ozljeda. Ozbiljnost AKI može varirati od blage do opasne, ali stanje može biti reverzibilno ako se pravovremeno i prigodno liječi. Međutim ako se ne liječi, ili ako se uzrok bolesti ne otkloni, AKI može napredovati u kroničnu bolest bubrega (*engl.* chronic kidney disease, CKD) ili završni stadij bolesti bubrega (*engl.* end-stage renal disease, ESRD), čije liječenje može zahtijevati dijalizu ili čak transplantaciju bubrega (Ozkok i Edelstein, 2014).

### **1.2.3. Toksični učinci na bubreg izazvani liječenjem cisplatinom**

Akutna ozljeda bubrega koju je izazvalo liječenje cisplatinom može se klasificirati u četiri tipa koja mogu biti u kombinaciji: toksičnost za bubrežni parenhim odnosno stanice kanalića (smrt stanice i apoptoza ili nekroza), vaskularno oštećenje (renalna vazokonstrikcija), glomerularna ozljeda (oštećenje glomerularnih odjeljaka uključujući kapilare, bazalnu membranu, podocyte, mezangijske i parientalne stanice), te intersticijalna ozljeda ostalih, stromalnih stanica bubrega zbog upale, kojima se regulira i sinteza EPO, (Volarevic i sur., 2019).



Ovaj kompleksan proces u kojem dolazi do ozljede bubrega je rezultat akumulacije toksičnih spojeva u filtratu unutar lumena kanalića, koji se onda prenose u selektivno permeabilne stanice kanalića. Kako je cisplatina, molekula male mase i bez naboja, slobodna ili vezana na proteine u plazmi filtrira se u glomerulima i na različite načine se transportira u stanice kanalića. Cisplatina se akumulira u bubrežnim tubularnim epitelnim stanicama, gdje izaziva proizvodnju ROS, što dovodi do oštećenja staničnih komponenti, uključujući lipide, proteine i DNA. Oksidativni stres dodatno aktivira signalne puteve koji promiču upalu i smrt stanica. Istraživanje također ukazuje da su upalni citokini i kemokini, kao TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , ključni medijatori u razvoju AKI izazvane cisplatinom, potičući infiltraciju upalnih stanica i dodatno oštećenje tkiva. Tako da su mehanizmi kojima cisplatina inducira AKI kompleksni i uključuju više komponenti kao oksidativni stres, upalu i apoptozu tubularnih stanica bubrega. (Volarevic i sur., 2019).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je rada istražiti promjene u prisutnosti obje podjedinice feritina kao posljedicu djelovanja cisplatine, na arhivskim uzorcima eksperimentalnog modela nefrotoksičnosti izazvane jednokratnom dozom cisplatine. Specifini ciljevi rada obuhvaćaju :

- a) otkrivanje imunohistokemijske raspodjele i prisutnosti feritina na tkivnim kriosekcijama fiksiranog tkiva bubrega korištenjem imunokemijskih molekularnih metoda sa specifičnim monoklonskim protutijelima za laku i tešku podjedinicu feritina.
- b) western blot metodom obradu uzoraka izoliranih homogenata iz bubrežnog tkiva, te metodom reverzne transkripcije i lančanom reakcijom polimeraze sa konačnim brojem ciklusa (*engl.* end-point RT-PCR), određivanje relativne ekspresije mRNA za obje podjedinice feritina u bubrežnom tkivu kontrolnih štakora i štakora tretiranih cisplatinom.

### 3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu u sklopu projekta MZOS "Mehanizmi toksičnosti teških metala u bubrezima i spolnom traktu" (Ljubojević, 2003). U mojim pokusima korišteni su arhivski uzorci mužjaka štakora soja Wistar. Životinje su bile uzgojene u Jedinici za laboratorijske životinje, gdje su tijekom eksperimenta imale slobodan pristup vodi i hrani.

Otopina cisplatine, u dozama od 5 mg cisplatine/kg t.m., i.p., jednokratno je ubrizgavana prema ustanovljenom protokolu za izazivanje eksperimentalne nefrotoksičnosti opisanom u radu Safirstein i suradnici (1987). Također, kontrolnim jedinkama štakora soja Wistar, ubrizgavan je ekvivalentan volumen puferirane fiziološke otopine s fosfatom (*engl.* phosphate buffer saline, PBS). Svaki od tri provedena eksperimenta imao je kontrolnu i tretiranu skupinu koja se sastojala od po četiri životinje.

#### 3.1. OTOPINE I PUFERI

- Plavilo za bojanje proteina: otopina plavila Coomassie 0,2 % (m/v) Coomassie plavilo u otopini za odbojavanje
- Otopina za odbojavanje: metanol : octena kiselina : re H<sub>2</sub>O u omjeru 5: 1: 4
- Fosfatni pufer (**PBS**): 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4.
- Pufer za denaturaciju proteina (**Laemmli-pufer**): 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (22 % v/v), 30% SDS (12 % v/v), 80% glicerol (54 % v/v), zasićena otopina plavila bromfenola (BPB) (12 % v/v). Puferu se neposredno prije uporabe dodaje beta merkaptioetanol, bME u omjeru 17:3
- Pufer za elektroforezu u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (**PAGE-pufer**): 25 mM Tris, 0,2 M glicin, 1 % (v/v) SDS
- Pufer za izolaciju homogenata iz tkiva (**homo-pufer**): 300 mM manitol, 5 mM EGTA, 12 mM Tris/HCl, pH 7,4
- Pufer za blokiranje (**bloto-mlijeko**): 5 % (m/v) nemasno mlijeko u prahu, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 20 mM Tris/HCl, 0,02% (v/v) NaN<sub>3</sub>, pH 7.4
- Pufer za prijenos proteina na membranu (**transfer-pufer**): 15,6 mM Tris, 120 mM glicin, 20 % (v/v) metanol

- Pufer za horizontalnu elektroforezu nukleinskih kiselina (**TAE-pufer**): 0,4 M Tris, 10 mM EDTA, 11.44 mL ledene octene kiseline/1L H<sub>2</sub>O (pH 8-8.5)
- Citratni pufer: 10 mM natrijev citrat otopljen u dvostrukom volumenu H<sub>2</sub>O (2,94 g/L) i limunska kiselina (2,1 g/L), u omjeru 1:1 (pH 6)
- Otopina etidijeva bromida: 1 mg/mL H<sub>2</sub>O

Otopine i puferi za elektroforezu u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (**SDS-PAGE**):

- akrilamid/ bis-akrilamid (AA/BA) : 30 g poliakrilamida/ 0,8 g bis-akrilamida u 100 ml H<sub>2</sub>O. Skladišti se na 4° C do upotrebe.
- pufer A : 1,5 M Tris-HCl, pH 8,9 (18.17 g/ 100 mL) – pufer za pripravljanje gela za odjeljivanje (engl. separating gel).
- pufer B : 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (6.06 g/ 100 mL) – pufer za pripravljanje gela za sabijanje (engl. stacking gel).
- amonijev persulfat (APS): 100 mg/ 7,1 mL H<sub>2</sub>O – napravljen svježi.
- 10 % (m/v) SDS u H<sub>2</sub>O.

### 3.2. UREĐAJI, MATERIJALI I KEMIKALIJE

- Spektrofotometar (CECIL 9000); Cambridge (Engleska, UK), pumpa za perfuziju (Masterflex pumpa); Cole-Parmer (Chicago, IL, SAD), kriomikrotom (Leica CM 1580); Leica Instruments (Nussloch, Njemačka), digitalna kamera (SPOT RT); Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, SAD), fluorescencijski mikroskop (OPTON III RS); Opton Feintechnik (Oberkochen, Njemačka); centrifuga s hlađenjem (Sorvall RC2B, rotor SS-34), aparatura Mini Protean III Cell, MiniTrans-Blot Cell za SDS-PAGE; BioRad (Hercules, CA, SAD) Centrifuga s hlađenjem 5417R; Eppendorf AG (Hamburg, Njemačka), električni homogenizator (Powergen 125); Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD), autoklav; Bari (Zagreb, Hrvatska), PCR uređaj 2720; Applied Biosystems- Termo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD),
- Hidrofobna najlonska membrana Immobilon (Polyvinylidene fluoride, PVDF); Millipore (Bedford, MA, SAD), PCR komplet (PCR Master Mix); Applied Biosystems- Termo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD), Predmetna stakalca (Superfrost/Plus Microscope slides); Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD), komplet za sintezu cDNA (First Strand cDNA Synthesis), komplet za pročišćavanje RNA (RNeasy Mini Kit); Qiagen (Hilden, Njemačka); GelStar, (Lonza)

Rad s eksperimentalnim životinjama → Cisplatina; Hexal AG (Holzkirchen, Njemačka), Narketan, Xylapan; Chassot (Bern, Švicarska)

Inhibiranje proteolitičke aktivnosti tijekom pripreme homogenata → Sigma Fast (St. Luis, MO, SAD)

Izolacija homogenata bubrega i priprema uzoraka za analizu proteina → EGTA (etilen-glikol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina), EGTA (etilen-glikol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina), BSA (albumin iz seruma goveda), BPB (brom-fenol-plavo), Limunska kiselina, octena kiselina; Kemika (Zagreb, Hrvatska), Sigma (St. Luis, MO, SAD), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie plavilo); Serva (Heidelberg, Njemačka). Glicerol; Merck (Darmstadt, Njemačka)

Analiza proteina western blot metodom → TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin); Sigma (St. Luis, MO, SAD), komplet BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat) i NBT (nitromodri tetrazolium klorid), amonijev persulfat (APS); Standardi molekulskih masa proteina; Termo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD), SDS (natrijev-dodecil-sulfat); Serva (Heidelberg, Njemačka), β-merkaptioetanol (bME), Tris, akrilamid, bis-akrilamid; Boehringer (Mannheim, Njemačka)

Priprema tkivnih sekcija za imunohistokemiju → Otopina za očuvanje fluorescencije (Vectashield); Vector Labs (Burlingame, CA, SAD), Paraformaldehid; EMS (Los Almitos, CA, SAD), NaN<sub>3</sub> (natrijev azid), metanol, octena kiselina, natrijev citrat, ksilol, izopropanol, etanol; Kemika (Zagreb, Hrvatska), sekundarno protutijelo GAMCY3, Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, SAD), sekundarno protutijelo GAMAP; Kirkegaard & Perry (Gaithersburg, MD, SAD), BSA (albumin iz seruma goveda); Sigma (St. Luis, MO, SAD)

Izolacija ukupne RNA i RT-PCR → početnice svih gena; (*on line*, MetaBion Int. Germany, dobavljač: [http://www.gorea-plus.hr/custom\\_primer/](http://www.gorea-plus.hr/custom_primer/)), UltraPURE voda (RNaza/DNaza čista voda), TRIzol; Gibco-BRL (Grand Island, NY, SAD), RNAlater, etidijev bromid, Sigma (St. Luis, MO, SAD)

### 3.3. PROTUTIJELO

Protutijela koja sam koristila su komercijalno dostupna monoklonska protutijela na teški lanac feritina (FtH (B-12): sc-376594) i laki lanac feritina (FtL (D-1): sc-390558), a proizvodi

ih tvrtka Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. Ova protutijela su razvijena protiv ljudskog oblika feritina, ali zbog visoke očuvanosti aminokiselinskih sekvenci imaju visoku homologiju sa štakorskim sljedom, što omogućuje njihovu primjenu za detekciju (slika 12.). Svako protutijelo prepoznaje visoko konzervirani aminokiselinski sljed specifičan za pojedini lanac feritina.

Korištena protutijela detektiraju proteinske pruge na ~ 20 kDa (FtL, protutijelo D-1, razrijeđenje 1:1000) i ~ 21 kDa (FtH, protutijelo B-12, razrijeđenje 1:500) western blot metodom, dok su u imunohistokemijskim tehnikama korištena za intracelularno bojanje bubrežnih kanalića.

U western blot metodi, sekundarno protutijelo korišteno za oba primarna monoklonska protutijela (D-1 i B-12) bilo je kozje protutijelo protiv mišjeg IgG-a (goat anti-mouse AP, GAM-AP) u koncentraciji od 0,25 µg/mL, obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom u razrjeđenju 1:1000.

Za imunohistokemijske tehnike, sekundarno protutijelo korišteno za oba primarna monoklonska protutijela bilo je magareće protutijelo protiv mišjeg IgG-a (donkey anti-mouse CY3, DAM-CY3), obilježeno fluorescirajućom CY3 (CYanine dye) molekulom koja daje crveno fluorescentno obojenje (ekscitacijski/emisijski maksimum 555/567 nm) u razrjeđenju 1:400.

Oba sekundarna protutijela bila su komercijalno dostupna i korištena prema uputama proizvođača. Proizvodi su tvrtke Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
>NP_002023.2 ferritin heavy chain [Homo sapiens] -teški lanac feritina - humana sekvenca
>NP_036980.1 ferritin heavy chain [Rattus norvegicus]-teški lanac feritina - štakorska sekvenca

NP_002023.2      MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQSD 60
NP_036980.1      MTTASPQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSCYFDRDDVALKNFAKYFLHQSD 60
                  *****

NP_002023.2      HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKVNQSLLELHK 120
NP_036980.1      HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDRDDWESGLNAMECALHLEKSVNQSLLELHK 120
                  *****

NP_002023.2      LATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSD 180
NP_036980.1      LATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKSIKELGDHVTNLRKMGAPESGMAEYLFDKHTLGHGD 180
                  *****

NP_002023.2      NES      183
NP_036980.1      ES-     182
                  :.

>NP_000137.2 ferritin light chain [Homo sapiens]- laki lanac feritina - humana sekvenca
>NP_071945.3 ferritin light chain 1 [Rattus norvegicus] -laki lanac feritina - štakorska sekvenca

NP_000137.2      MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKR 60
NP_071945.3      MTSQIRQNYSTVEAAVNRLVNLHLRASYYTYLSLGFYFDRDDVALEGVGHFFRELAEEKR 60
                  *.*****.*****

NP_000137.2      EGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNQALLDLHALGSA 120
NP_071945.3      EGAERLLKLNQRGGRALFQDVQKPSQDEWGKTEAMEAALALEKKNQALLDLHALGSA 120
                  ** *****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*****

NP_000137.2      RTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPE-----AGLGEYLFERLTL 172
NP_071945.3      RTDPHLCDFLESHFLDKEVKLIKKMGNHLTNLRRVAGPPAQTGVAQASLGEYLFERLTL 180
                  *****:*.*****:*****:*.*****:*.*****:*.*****

NP_000137.2      KHD      175
NP_071945.3      KHD      183
                  ***

```

**Slika 12.** Prikaz usporedbe humanih i štakorskih sekvenci za teški i laki lanac feritina (www.ncbi.nlm.nih.gov; www.ebi.ac.uk). Zvijezdicama su označeni identični aminokiselinski ostatci, a linijom iznad sekvenci označeni su sljedovi aminokiselina korišteni za razvoj specifičnih protutijela protiv FtH i FtL.

### 3.4. Priprema homogenata iz specifičnih regija bubrega

Za izolaciju bubrežnih tkivnih homogenata primijenjena je metoda diferencijalnog centrifugiranja. Štakori su usmrćeni iskrvarenjem pod anestezijom s Narketanom i Xylapanom. Nakon vađenja, bubrezi su odmah stavljeni u hladni PBS. Da bih izolirali ukupnu staničnu RNA, uzet je središnji poprečni rez bubrega debljine oko 1 mm iz kontrolnih jedinki i jedinki tretiranih cisplatinom, koji je potom smješten u RNAlater otopinu na 4 °C preko noći. Ostale tkivne sekcije su ručno razdvojene na korteks, unutarnji sloj vanjske medule i vanjski sloj vanjske medule. Uzorci stavljeni u hladni homogenizacijski pufer s dodatkom inhibitora

proteaza SigmaFast uz 1 mM PMSF. Homogenizirani su električnim homogenizatorom Powergen 125 (1 minuta pri najvećoj brzini, pauza od 2 minute, a zatim ponovna homogenizacija 1 minuta). Tkivne sekcije su rezane na ledenoj površini, a svi korišteni puferi također su bili na niskim temperaturama. Homogenati su centrifugirani u centrifugi Sorvall RC2B pri 6,500 rpm (5,000 x g) tijekom 15 minuta s hlađenjem, kako bi se istaložile cijele stanice, jezgre i nerazgrađeni tkivni matriks. Dobiveni nadtalog korišten je kao uzorak homogenata bubrežnog tkiva. Uzorci su pohranjeni u zamrzivaču na -70 °C za kasniju upotrebu u eksperimentima. Količinu obje podjedinice feritina u ovim uzorcima odredila sam pomoću western blot metode.

### **3.5. Kvantitativna analiza proteina**

Za mjerenje koncentracije proteina u uzorcima izoliranih membrana koristila sam spektrofotometrijsku metodu prema Bradfordu (1976). Ova metoda se temelji na reakciji vezanja boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteine, pri čemu boja mijenja svoje ionsko stanje i apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od 595 nm. Standardnu krivulju koncentracije proteina sam dobila mjerenjem otopine albumina iz goveđeg seruma (*engl.* bovine serum albumin, BSA) u rasponu koncentracija od 0,2 do 1,2 mg/mL. Metoda ima osjetljivost od 0,1 mg/mL. Uzorke sam razrijedila kako bi optička gustoća bila unutar linearnog područja standardne krivulje i očitala nakon 10 minuta u otopini boje. Optičku gustoću sam mjerenjem usporedila s kontrolnom probom (uzorak bez proteina). Sva mjerenja su provedena spektrofotometrom CECIL 9000, a koncentracije proteina u uzorcima očitane su na temelju standardne krivulje.

### **3.6. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i western blot metoda**

Za pripremu uzoraka za SDS-PAGE, koncentraciju proteina u homogenatima postavila sam na 3 mg/mL. Da bih proteine denaturirala, pomiješala sam uzorke s Laemmli puferom u omjeru 1:2, pri čemu je konačna koncentracija proteina u uzorku bila 2 mg/mL. Ova smjesa uključivala je 1% SDS, 12% (v/v) glicerola, 30 mM Tris/HCl (pH 6.8), tragove BPB i 5% bME. Prije nego što sam nastavila s western blot metodom, ispitala sam osjetljivost proteina homeogenata bubrega na termičku obradu i promjene u njihovoj konformaciji redukcijom. Uzorke sam

zagrijavala na različitim temperaturama: 37 °C tijekom 30 minuta, 65 °C tijekom 15 minuta ili 95 °C tijekom 5 minuta, s ili bez  $\beta$ -merkaptetanola (bME), koji razara disulfidne veze u proteinskim strukturama. Optimalni uvjeti za dobivanje jasnih proteinskih pruga kod obje podjedinice feritina bili su zagrijavanje na 95 °C tijekom 5 minuta uz prisutnost bME.

Metoda SDS-PAGE omogućuje razdvajanje proteina u električnom polju temeljenom na njihovoj masi. Proteini se oblažu negativnim nabojem pomoću deterdženta SDS-a, što omogućuje razdvajanje samo na temelju mase, pri čemu je prijedni put kroz poliakrilamidni gel obrnuto proporcionalan logaritmu molekulske mase proteina. Gel se sastoji od dva dijela: kiseli gel za sabijanje s gustoće 4% i alkalni separacijski gel gustoće od 10% AA/BA, koji omogućava razdvajanje proteina prema njihovoj masi. Osim uzoraka homogenata (16–24  $\mu$ g, ovisno o zoni bubrega), razdvajala sam i standardni uzorak molekulske mase u rasponu od 10 do 200 kDa pripremljen na isti način kao uzorci proteina iz bubrega.

Za SDS-PAGE elektroforezu koristila sam Mini Protean III aparat pri konstantnom naponu od 100 V tijekom 2 sata. Nakon toga, proteine s gela sam prenijela na hidrofobnu najlonsku membranu Immobilon koristeći MiniTrans-Blot Cell aparat, pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 2 sata. Uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu provjerila sam bojanjem otopinom Coomassie Blue te ispirala PVDF membranu u otopini za odbojavanje. Sljedeći korak bio je inkubacija membrane u bloto-mlijeku tijekom 1 sata kako bi se proteinom iz mlijeka, kazeinom blokiralo nespecifično vezanje protutijela. Nakon toga, obezbojene i blokirane PVDF membrane inkubirala sam s otopinama primarnih protutijela (razrijeđenih u bloto-mlijeku) preko noći na 4 °C uz miješanje. Razrjeđenja primarnih protutijela bila su 1:1000 za FtL i 1:500 za FtH. Nakon toga, membrane sam višekratno isprala bloto-mlijekom bez protutijela i zatim ih inkubirala s otopinom sekundarnog protutijela na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata.

Za oba primarna monoklonska protutijela koristila sam sekundarno protutijelo GAM-AP u koncentraciji od 0,25  $\mu$ g/mL. Nakon što sam membrane isprala u bloto-mlijeku tri puta po 10 minuta i u PBS dva puta po 5 minuta, provela sam reakciju s supstratom alkalne fosfataze, BCIP/NBT, u alkalnom puferu (20 mM Tris, pH 9). Ova reakcija rezultirala je razvijanjem smeđe-ljubičaste boje. Boja se pojavljuje zbog oksidacijske reakcije između alkalne fosfataze i BCIP/NBT na mjestima gdje se sekundarno protutijelo veže za primarno protutijelo, koje je povezano s antigenom. Tijekom reakcije, fosfatna skupina (Pi) se odvaja od 5-bromo-4-kloro-3-indolila (BCIP), što uzrokuje oksidaciju i stvaranje indiga. Indigo zatim reducira NBT u diformazan, stvarajući netopljiv smeđe-ljubičasti talog. Intenzitet ove boje proporcionalan je



količini prisutnog antigena, što mi omogućuje denzitometrijsku procjenu sadržaja antigena u svakom uzorku.

### **3.7. Denzitometrijska mjerenja**

Relativni sadržaj antigena u prugama dobivenim western blot metodom procijenila sam pomoću denzitometrijskih mjerenja u programu Image J (NIH, Bethesda, SAD). Svaki uzorak bio je označen na identičnoj površini proteinske pruge i izvršena je analiza gustoće obojenja. Rezultati su prikazani kao relativne gustoće u usporedbi s najintenzivnijom prugom (=1) iz kontrolne skupine. Obrada podataka, crtanje grafova i izrada panela provedena je u programima Excel odnosno Adobe Photoshop 6.0.

### **3.8. Perfuzija i *in vivo* fiksacija tkiva**

Štakori su uspavani koristeći dvokomponentni anestetik u odgovarajućim omjerima: Narketan (80 mg/kg tjelesne mase) i Xylapan (12 mg/kg tjelesne mase) primijenjen intraperitonealno. Nakon uspavlivanja, izvršena je perfuzija krvnog sustava kroz lijevu klijetku srca. Prvo je korišten PBS, koji je bio aeriran mješavinom plinova (95% O<sup>2</sup> i 5% CO<sup>2</sup>) i zagrijan na 37 °C, tijekom 2-3 minute, a zatim je perfuzija nastavljena s fiksativom PLP (sastavljenim od 4% paraformaldehida, 10 mM natrijeva perjodata i 70 mM lizina) u trajanju od 4-5 minuta (prema McLean i Nakane, 1974). Nakon toga, bubrezi su izvađeni, dekapulirani i razrezani transverzalno na više dijelova. Rezovi bubrega su ostali u istom fiksativu pri 4 °C tijekom noći. Nakon fiksacije, tkiva su isprana u PBS-u četiri puta po 10 minuta i pohranjena u PBS-u s 0,02% NaN<sub>3</sub> pri 4 °C do daljnje uporabe.

### **3.9. Tkivne sekcije**

Tkivne sekcije pripremila sam tako što sam fiksirane uzorke stavila namakati preko noći u 30% otopini saharoze u PBS-u kako bih zaštitila stanične strukture od oštećenja pri niskim temperaturama. Nakon toga, tkivo sam uklopila u polimerni medij O.C.T. Compound 4583, smrznula ga u kriostatu na -25 °C, te narezala tanke rezove debljine 4 µm kriomikrotomom Leica CM 1580, koje sam nalijepila na Superfrost/Plus Microscope predmetna stakalca te

dobila krio-sekcije za imunohistokemiju koje sam također pohranila pri 4 °C do daljnje uporabe.

### **3.10. Indirektna imunofluorescencija**

Da bih postigla optimalno imunohistokemijsko označavanje, koristila sam utvrđenu metodu koja uključuje tretman neionskim deterdžentima i zagrijavanje u citratnom puferu pri pH 6. Ova termička obrada u citratnom puferu omogućava bolje otkrivanje epitopa za protutijela. Nakon rehidracije tkivnih sekcija u PBS-u, provela sam termičku obradu u mikrovalnoj pećnici koristeći blago kiseli citratni pufer (pH 6) zajedno s različitim koncentracijama neionskog deterdženta Triton X-100 (CT6) (Vulinović i sur, 2022).

Tkivne krio-sekcije bubrega, koje sam prethodno pripremila na predmetnim stakalcima, rehidrala sam u PBS-u tijekom 10 minuta. Nakon toga sam tkivne kriosekcije kuhala u 10 mM citratnom puferu, pH 6, tijekom četiri ciklusa od po 5 minuta, te ih ostavila u istom puferu 20 minuta da se ohlade. Sljedeće, isprala sam sekcije u PBS-u tri puta po 5 minuta, a zatim ih stavila u 0,5% Tritonu X-100 u PBS-u 15 minuta. Tkivne sekcije sam zatim obradila s 2% Tritonom X-100 u PBS-u 30 minuta, te ih ponovo isprala u PBS-u tri puta po 5 minuta. Kako bih blokirala nespecifična vezivanja, prekrila sam tkivne sekcije 1%-tnom otopinom BSA u PBS-u 30 minuta. Završno, prekrila sam tkivne sekcije jednom od otopina primarnog protutijela za feritinske lance (1:100 u PBS) i ostavila ih na inkubaciju pri 4°C preko noći. Sljedećeg dana, isprala sam tkivne krio-sekcije u 0,1% Tritonu X-100 u PBS-u 10 minuta, a potom u PBS-u tri puta po 5 minuta. Tkivne krio-sekcije sam zatim inkubirala u otopini sekundarnog protutijela DAMCY3 (2 µg/mL u PBS) na sobnoj temperaturi. Nakon dodatnog ispiranja u 0,1% Tritonu X-100 u PBS-u dva puta po 10 minuta i u PBS-u, preparate tkivnih krio-sekcija prekrila sam otopinom Vectashield s DAPI bojom za jezgre i pokrovnim stakalcem, te ulazak zraka spriječila obrublivanjem pokrovnice lakom za nokte.

Sve obojene tkivne krio-sekcije analizirala sam koristeći fluorescencijski mikroskop OPTON III RS. Pozitivne nalaze sam dokumentirala digitalnom kamerom SPOT RT, a slike su obrađene na računalu Compaq E.V.O. (Pentium 4 PC) koristeći računalni program Adobe Photoshop 6.

### **3.11. Izolacija i ekstrakcija ukupne RNA iz tkivnih uzoraka**

Priprema tkiva za izolaciju RNA koja će poslužiti za daljnju analizu RT-PCR-om (reverzna transkripcija-lančana reakcija polimerazom) ključni je korak o kojem ovisi cijeli postupak analize. Svi postupci koji uključuju rad s RNA izvedeni su s posebnim oprezom kako bi se minimalizirala aktivnost ribonukleaze (RNaza). Korišteno je posuđe koje je prethodno autoklavirano, a voda je tretirana DEPC-om (120 °C, 20 minuta, 1.4 atm) kako bi se osigurala čistoća tijekom ovih postupaka.

Izolacija ukupne RNA provedena je iz kore bubrega, koja je prethodno ručno izdvojena iz poprečne tkivne sekcije koristeći otopinu TRIzol prema uputama proizvođača. TRIzol je reagens koji se koristi za izolaciju ukupne RNA iz bioloških uzoraka. Ovaj reagens, predstavlja monofaznu otopinu koja sadrži fenol i gvanidinij izotiocijanat. TRIzol ne samo da otapa biološki materijal, već također denaturira proteine, omogućujući učinkovitu ekstrakciju RNA.

Tkivne sekcije bubrega su prije toga bile pohranjene u otopini RNAlater s inhibitorima RNaza, što je omogućilo očuvanje cjelovitosti RNA pri -20 °C tijekom duljeg vremenskog perioda. Nakon izolacije, RNA je dodatno pročišćena korištenjem kompleta za pročišćavanje RNA (Qiagen, RNeasy Mini Kit) kako bi se uklonile nečistoće poput soli, proteina, drugih nukleinskih kiselina i organskih otapala korištenih za izolaciju RNA slijedeći upute proizvođača.

Čistoća izolirane RNA određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm (nukleinske kiseline), 280 nm (proteini) i 230 nm (soli). Omjeri 260/280 (1.6-1.8 u vodi) i 260/230 (>2 u vodi) korišteni su za procjenu čistoće RNA. Otopine uzoraka za spektrofotometrijska mjerenja pripremljene su u autoklaviranoj vodi tretiranoj DEPC-om. Koncentracija RNA izračunata je prema Lambert-Beerovom zakonu, pri čemu je apsorbancija izmjerena na 260 nm pomnožena s ekstinkcijskim koeficijentom (44.19 za RNA) i faktorom razrjeđenja.

Kvaliteta izolirane RNA i moguća kontaminacija genomske DNA procijenjeni su elektroforezom na 1% agaroznom gelu, pripremljenom u TAE puferu. Gel je bio obogaćen s 0,1% etidij bromida, koji interkalira u RNA lance i omogućuje njihovu vizualizaciju pod UV lampom. Analizirani su uzorci izolirane RNA, pri čemu su se na gelu prikazivale dvije oštre vrpce ribosomalne RNA (18S, 2 kb i 28S, 5 kb) s očekivanim omjerom od 2:1, što indikativno ukazuje na visok stupanj čistoće RNA.

### **3.12. Reverzna transkripcija (RT)**

Sinteza prvog lanca cDNA izvedena je pomoću First Strand cDNA Synthesis Kit-a, slijedeći upute proizvođača. Ukupna stanična RNA (3 µg) denaturirana je pri 70 °C tijekom 5 minuta u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 0,5 µg oligo(dT)18. Zatim je započela reverzna transkripcija u ukupnom volumenu od 20 µL, pri čemu su korišteni sljedeći konačni omjeri u smjesi: 1x pufer za reverznu transkripciju, 20 jedinica inhibitora ribonukleaza, 1 mM mješavina dNTP-ova i 40 jedinica reverzne transkriptaze M-MuLV. Reakcijska smjesa inkubirana je pri 37 °C tijekom 60 minuta, nakon čega je inaktivacija enzima provedena pri 72 °C tijekom 10 minuta, u skladu s preporukama proizvođača. Dobivena cDNA razrijeđena je 5x u UltraPURE vodi (bez DNaza/RNaza) i pohranjena pri –20 °C do daljnje upotrebe. Uz svaku RT reakciju, provedena je i kontrolna reakcija bez RNA, koristeći istu količinu UltraPURE vode, radi provjere mogućeg onečišćenja genomskom DNA.

### **3.13. Polimerazom posredovana lančana reakcija (PCR) nakon RT (RT-PCR)**

U PCR reakciji koristila sam PCR Master Mix kit te pripremila smjesu u skladu s uputama proizvođača. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20 µL, uključujući 1 µL 5x razrijeđene otopine prve lančane cDNA te 0,4 µM specifičnih početnica. Sekvence specifičnih početnica dizajnirala sam pomoću online računalnog programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) nakon identifikacije relevantnih nukleotidnih sekvenci štakora iz baze podataka NCBI Entrez (*Rattus norvegicus* feritin (FtL i FtH), mRNA - Nucleotide - NCBI (nih.gov)). Provjeru pozicija početnica na različitim egzonima izvršila sam putem programa SpliceCenter Primer Check (<https://www.tigerteamconsulting.com/SpliceCenter/SpliceOverview.jsp>), koji na žalost više nije dostupan, dok sam obilježja početnica dodatno analizirala pomoću Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>). Početnice u koncentraciji 100 mM pripremila sam iz liofiliziranog materijala kupljenog od tvrtke MetaBion, a zatim sam pripremila radne otopine u koncentraciji 10 mM. Specifične početnice korištene u PCR reakcijama, kao i veličine dobivenih PCR-produkata, navedene su u Tablici 1. PCR reakcije provedene su u uvjetima početne denaturacije na 94 °C tijekom 3 minute, nakon čega je slijedio 21 ciklus sa slijedećim fazama: denaturacija pri 95 °C 30 sekundi, vezanje početnica pri 57 °C 30 sekundi, elongacija pri 72 °C tijekom 45 sekundi. Uz svaku PCR reakciju uključena je i negativna kontrola bez cDNA uzorka, pri čemu je volumen UltraPURE vode (bez DNaza/RNaza) bio jednak volumenu cDNA, kako bi se detektirala eventualna kontaminacija.

Dobivene PCR produkte razdvojila sam elektroforezom na agaroznom gelu (1,5% TAE pufer) s dodatkom GelStar boje (5 µL). Gel je zatim izložen UV svjetlu i snimljen. Za svaki ciljani gen odredila sam optimalan broj ciklusa kako bi formiranje produkta bilo u eksponencijalnoj fazi PCR-a. Kao kontrolu za varijacije u količini RNA/cDNA između uzoraka koristila sam tzv. referentne gene s vjerojatno stabilnom ekspresijom, poput ciklofilina B i GAPDH.

Tablica 1. Sljedovi oligonukleotidnih početnica korištenih u reakcijama PCR.

<b>Geni i registracijski broj u bazi podataka</b>		<b>nukleotidni sljed (5'-3')</b>	<b>položaj</b>	<b>veličina PCR-produkta (pb)</b>
<b>GAPDH</b> NM_017008.2	<b>u</b>	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	1105-1125	369
	<b>n</b>	GGATGCAGGGATGATGTTCT	1453-1473	
<b>cyclophilin B</b> NM_022536.1	<b>u</b>	CAAGACCTCCTGGCTAGACG	469-489	344
	<b>n</b>	AAAATCAGGCCTGTGGAATG	792-772	
<b>laki lanac ferritina 1 FtL</b> NM_022500.4	<b>u</b>	TCTCCTCAAGTTGCAGAACG	400-420	246
	<b>n</b>	TTGCCCATCTTCTTGATGAG	645-625	
<b>teški lanac ferritina 1 FtH</b> NM_012848.2	<b>u</b>	ATGTGGCCCTGAAGAAGCTTT	264-284	300
	<b>n</b>	TGGATTTCACCTGCTCATTC	563-543	

### 3.14. Statistička obrada i prikaz rezultata

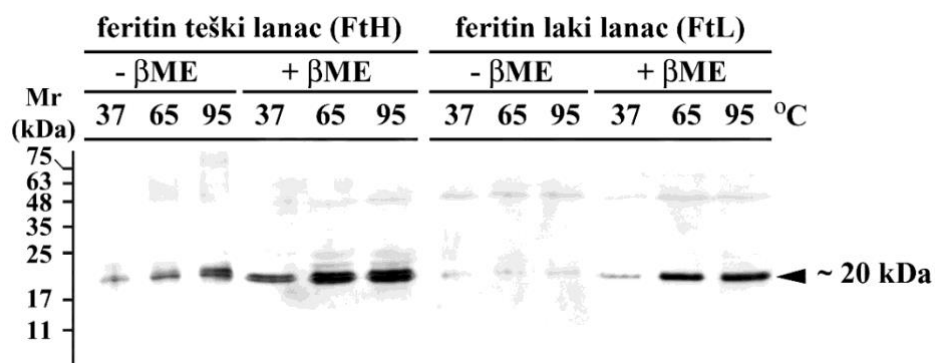
Rezultati 3-4 neovisna pokusa imunohistokemije, western blot metode i RT-PCR prikazani su reprezentativnim slikama, pri čemu su broječni rezultati izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (SP). Podaci su statistički obrađeni Studentovim t-testom na razini značajnosti od bio od 95% ili 99% odnosno  $P < 0,001$  ili  $P < 0,05$ , koristeći računalni program Excel (Microsoft Office, SAD) za statističku analizu i grafički prikaz. Imunohistokemijske slike odabrane su subjektivnim probirom i prikazuju reprezentativne rezultate raspodjele unutarstaničnog feritina u bubrežnim kanalčićima, dok rezultati western blot metode prikazuju ukupnu količinu traženog proteina.

## 4. REZULTATI

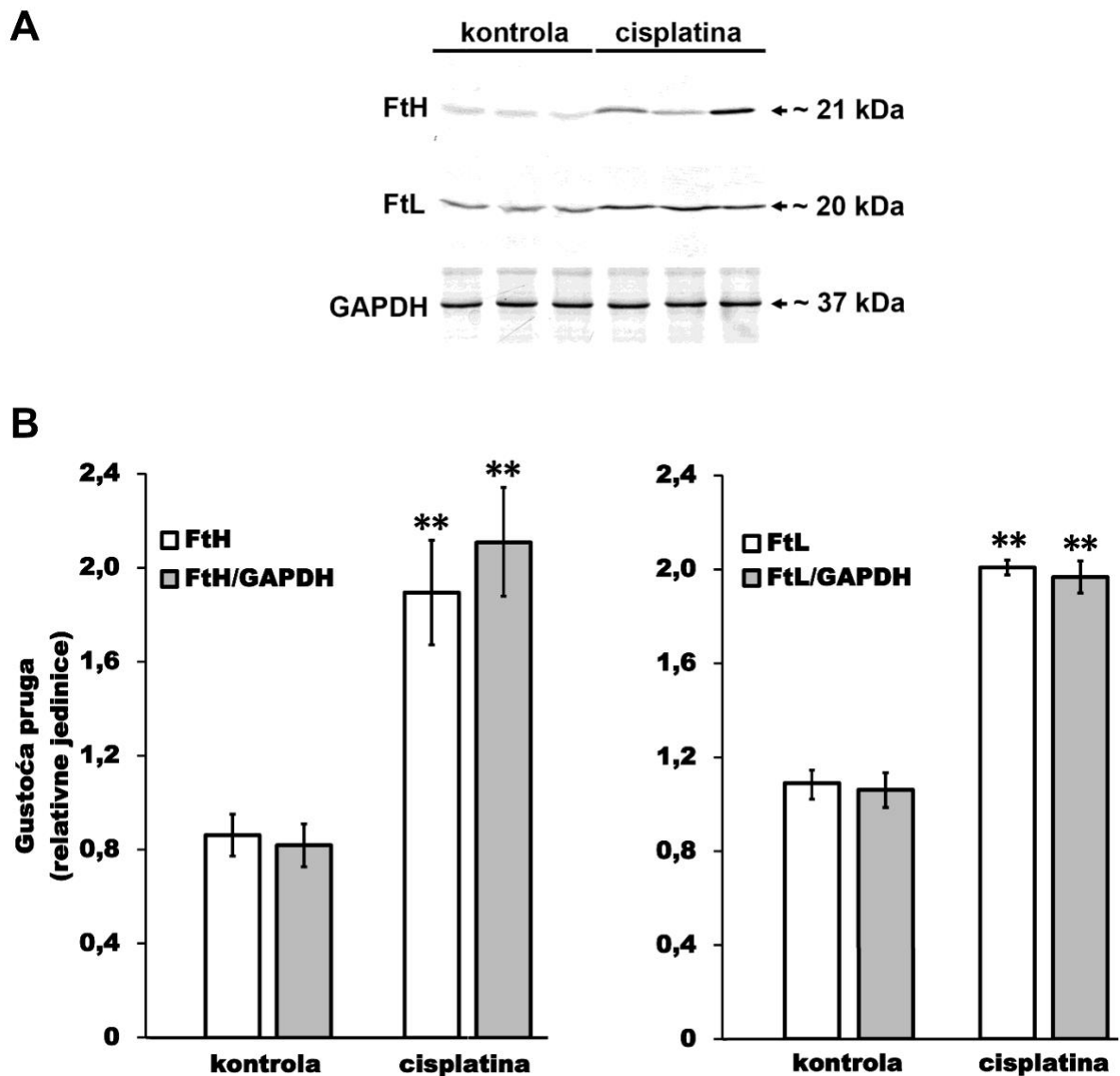
Istraživanje koje sam napravila se bavi analizom kako cisplatina, kemoterapijski lijek sa izraženim nefrotoksičnim svojstvima (štetnim za bubrege), utječe na feritin protein odgovoran za skladištenje željeza u stanicama, odnosno ekspresiju teškog (FtH) i lakog (FtL) proteinskog lanca koji grade njegovu strukturu nanokaveza.

#### 4.1. Rezultati western blot metode i ekspresije FtH i FtL u uzorcima homogenata bubrega

Western blot metoda pokazala je prisutnost feritinskih podjedinica pri molekularnim masama od 21 kDa i 19 kDa (Slika 13.), što odgovara teškoj (FtH) i lakoj (FtL) podjedinici feritina (Vulinović i sur, 2022). Ovo potvrđuje prisutnost obje podjedinice u bubrežnom tkivu. Istraživanje sam provela na arhivskim uzorcima bubrega, specifično analizirajući teške i lake lance feritina. Uzorci su bili homogenati izolirani iz različitih dijelova bubrega: korteksa (K), vanjskog pojasa vanjske medule (V), te unutarnje medule koja uključuje unutarnji pojas vanjske medule i papilu (U). Uzorci su prvo pripremljeni u reducirajućim uvjetima s dodatkom  $\beta$ -merkaptoetanolom, kao i u nereducirajućim uvjetima, bez dodavanja  $\beta$ -merkaptoetanolom. Dodatno, uzorci su podvrgnuti različitim temperaturnim tretmanima, uključujući inkubaciju na 95 °C tijekom 5 minuta, 65 °C tijekom 15 minuta, te 37 °C tijekom 30 minuta, kako bi se procijenila stabilnost feritinskih podjedinica pod tim uvjetima i odredio optimalni uvjet za pripremu uzoraka iz eksperimenta (Vulinović i sur, 2022).



**Slika 13.** Određivanje optimalnih uvjeta za western blot metodu teškog i lakog lanca feritina u uzorcima homogenata kore kontrolnih bubrega. Za teške i lake lance feritina (sc-376594 (FtH) i sc-390558 (FtL)) u navedenim uzorcima, najbolji uvjeti za prikaz proteinskog pruge za svaki lanac posebno, pokazalo se reducirajući stanje koje čini prisutnost  $\beta$ -merkaptoetanol (βME), dodatno ovisno o termičkoj obradi 95 °C kroz 5 minuta.



**Slika 14.** Prikaz rezultata western blot metode teškog (FtH) i lakog (FtL) lanca feritina kod kontrolnih (kontrola) i životinja obrađenih cisplatinom (cisplatina) (A), uz denzitometrijsko mjerenje (B). Uzorci homogenata tkiva iz kore bubrega uspješno su rehomogenizirani i izolirani. Predočen je samo jedan reprezentativan prikaz PVDF membrane nakon western blot metode uz prikaz ekspresije „housekeeping“ proteina GAPDH. Napravljeno je nekoliko

membrana sa sličnim rezultatom ali nešto lošije kvalitete (nije prikazano) te je na reprezentativnim uzorcima (n=6 za obje skupine) provedeno denzitometrijsko mjerenje i prikazano grafom samih ciljnih proteina te u odnosu sa GAPDH homogenom ekspresijom. Rezultati su prikazani grafički (B) uz statističku značajnost od 99% (\*\*- p < 0,001).

#### **4.2. Imunofluorescencijsko obojenje FtH i FtL na krio-sekcijama bubrega**

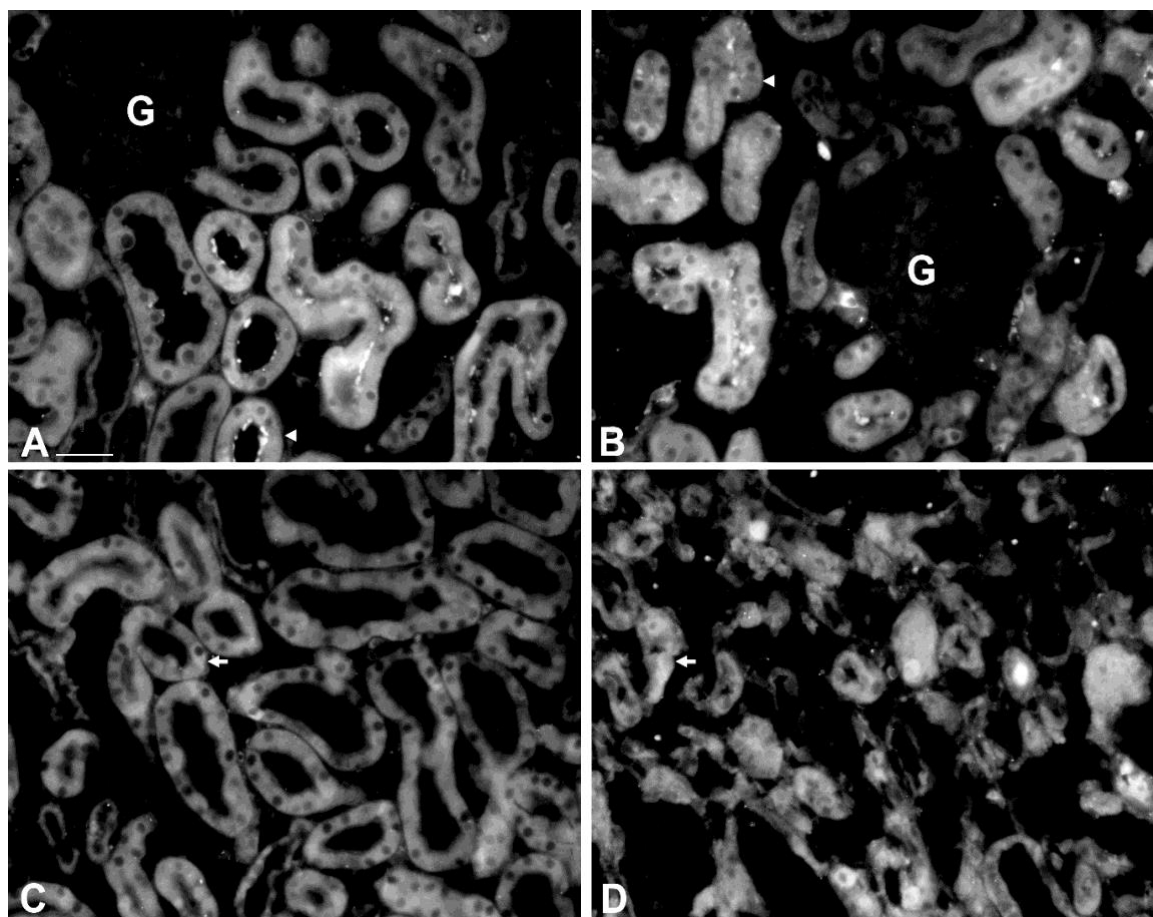
Za imunohistokemijsku analizu na uzastopnim tkivnim sekcijama bubrega štakora korištena su primarna antitijela protiv lakog (FtL; D-1) i teškog lanca (FtH; B-12) feritina, dok je za detekciju primijenjeno sekundarno antitijelo označeno DAM-CY3 fluoroforom. Primijenila sam uvjete CT6, koji su na kontrolnim bubrezima proizveli očekivane rezultate (Slika 14.) (Vulinović i sur, 2022). Slikama 15. i 16. je jasno prikazana promjena u prisutnosti i raspodjeli lake odnosno teške podjedinice feritina u bubrežnom tkivu kore i vanjskog tračka vanjske srži, pod utjecajem cisplatine. Faza subakutne nefrotoksičnosti pokazuje snažno povećanje ekspresije oba feritina, što ukazuje na učinak cisplatine na cijeli bubreg, a ne samo oštećeni dio S3 odsječka. Opisane promjene mogu biti obrambeni odgovor tkiva kore bubrega na povećane razine slobodnog željeza i oksidativni stres izazvan cisplatinom.



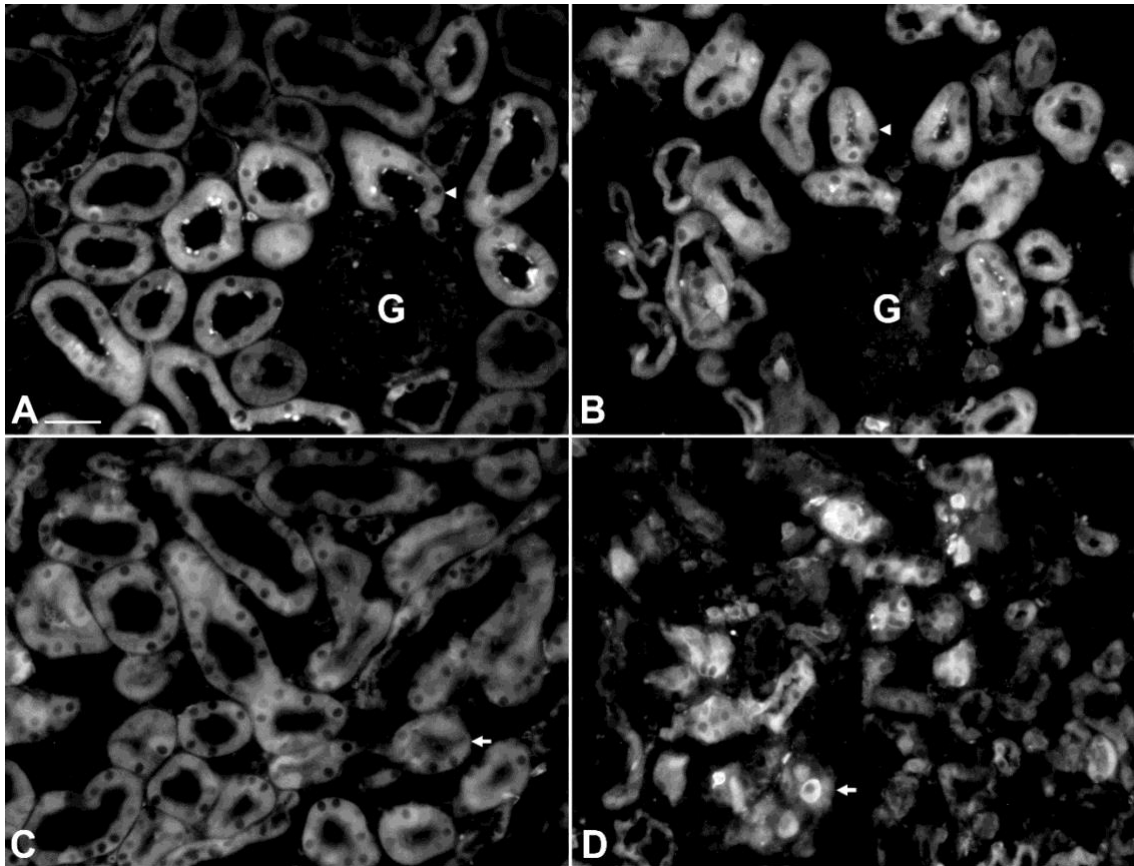


**Slika 15.** Usporedni imunohistokemijski prikaz obojenja FtL (a) i FtH (b), na sekvencijalnim krio-sekcijama, u kortikalnoj i regiji vanjskog tračka vanjske srži bubrega mužjaka bubreg odraslog kontrolnog štakora, pri optimalnim prethodno utvrđenim uvjetima CT6. Oba feritinska protutijela snažnim obojenjem pokazuju unutarstanično prisustvo u svim

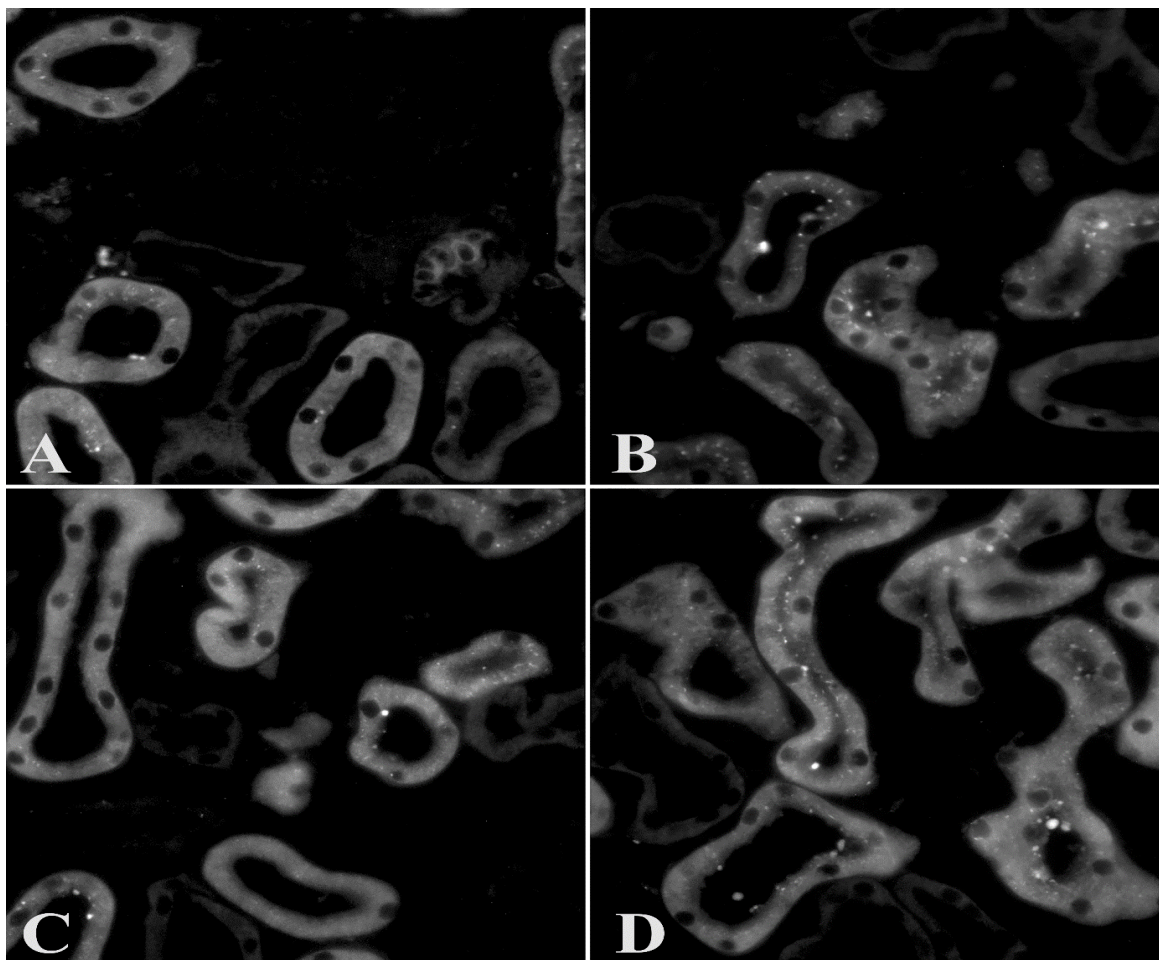
proksimalnim kanalićima nefrona kore (a1,2; b1,2) te jukstamedularnih (a3, b3) u kortikalnoj regiji bubrega uz povremeno prisutne intracelularne i intratubularne vezikule pozitivne na oba protutijela feritina (a1,2,3; b1,2,3, vrh strelice). U vanjskom tračku vanjske srži slabije su mozaično pozitivni S3 odsječci proksimalnih kanalića s ponekom jače obojenom epitelnom stanicom i pozitivnim obojenjem nad četkastom membranom epitelnih stanica (a4, b4, zvijezda). Sabirni kanalići koji prolaze regijom (a, b, strelica) također su pozitivni na obojenje s oba feritinska protutijela. Obojenje više struktura i kanalića feritinskim protutijelom za teški lanac uključuje endotel krvnih žila i glomerularni splet (G), te silaskom prema unutarnoj srži pozitivno jest obojenje tankog uzlaznog kraka Henleove petlje (b4, ljestve). Mjera a,b = 50  $\mu$ m; a,b1-4 = 25  $\mu$ m



**Slika 16.** Imunohistokemijski prikaz obojenja lake podjedinice feritina (FtL) u kori (A, B) i vanjskom tračku vanjske srži (C, D) kontrolnih (A, C) i cisplatinom (B, D) obrađenih životinja. U proksimalnim bubrežnim kanalićima kontrolnih (A) i eksperimentalnih, cisplatinom obrađenih životinja (B), u kori oko glomerula (G) intenzivno su pozitivno obojeni S2 odsječci PK (A) dok se nakon 5 dana tretmana cisplatinom vidi porast jačine obojenja navedenih kanalića (B, vrh strelice). U kontrolnim uzorcima vanjskog tračka vanjske srži (C, strelica) obojenje epitelnih stanica je homogeno uz koju mozaičnu stanicu jačeg intenziteta, dok PK S3 odsječka nakon 5 dana tretmana cisplatinom epitelne stanice gube strukturu i pokazuju heterogeno obojenje pojedinih intenzivnih stanica (D, strelica). Mjera A = 25  $\mu$ m.



**Slika 17.** Imunohistokemijski prikaz obojenja teške podjedinice feritina (FtH) u kori (A, B) i vanjskom tračku vanjske srži (C, D) kontrolnih (A, C) i cisplatinom (B, D) obrađenih životinja. U proksimalnim bubrežnim kanalićima kontrolnih (A) i eksperimentalnih, cisplatinom obrađenih životinja (B), u kori oko glomerula (G) intenzivno su pozitivno obojani S1 i S2 odsječci PK (A, vrh strelice) dok se nakon 5 dana tretmana cisplatinom ne vidi izražena promjena jačine obojenja navedenih kanalića. U kontrolnim uzorcima vanjskog tračka vanjske srži (C, strelica) obojenje epitelnih stanica na FtH također je homogeno uz koju mozaičnu stanicu jačeg intenziteta, dok PK S3 odsječka nakon 5 dana tretmana cisplatinom gube strukturu i pokazuju vrlo intenzivno heterogeno obojenje pojedinih epitelnih stanica i ostataka očuvanih kanalića (D, strelica). Mjera A = 25  $\mu$ m.



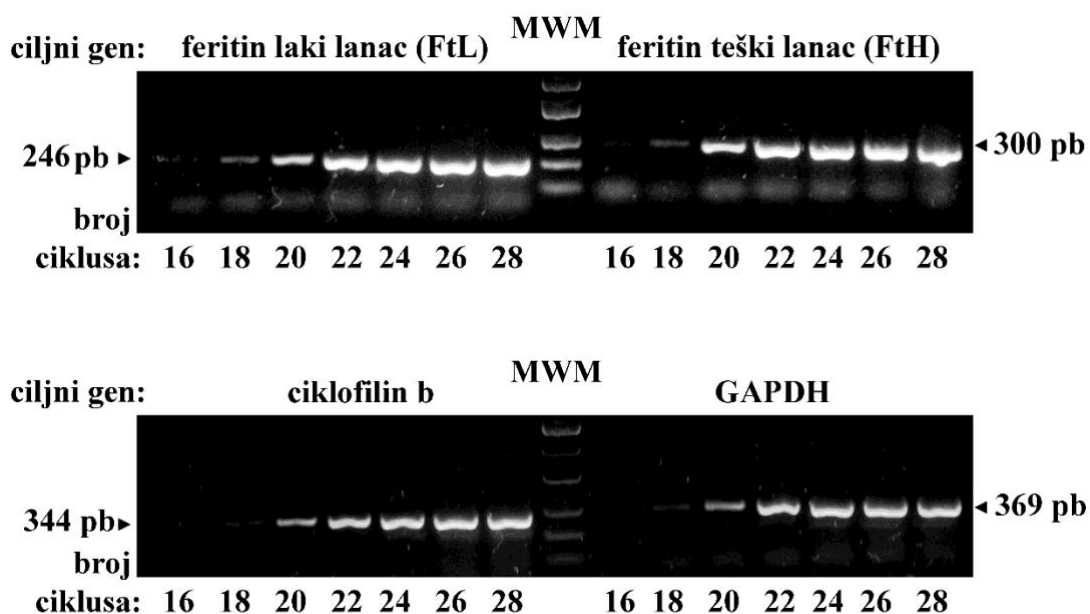
**Slika 18.** Imunohistokemijski prikaz obojenja FtH i FtL u kori bubrega s proksimalnim kanalićima oko glomerula (G) Ova slika prikazuje imunohistokemijsko obojenje teškog i lakog lanca feritina (FtH i FtL) u kori bubrega, s posebnim naglaskom na proksimalne kanaliće koji okružuju glomerule te pokazuju sa oba protutjela pozitivnu vezikularnu strukturu i egzocitirane vezikule, kako u kontroli - manje zastupljeno (A i C) tako i nakon 5 dana tretmana cisplatinom - učestalo prisutno i intenzivno (B i D).

### 4.3. Rezultati RT-PCR analize semikvantifikacije mRNA FtH i FtL

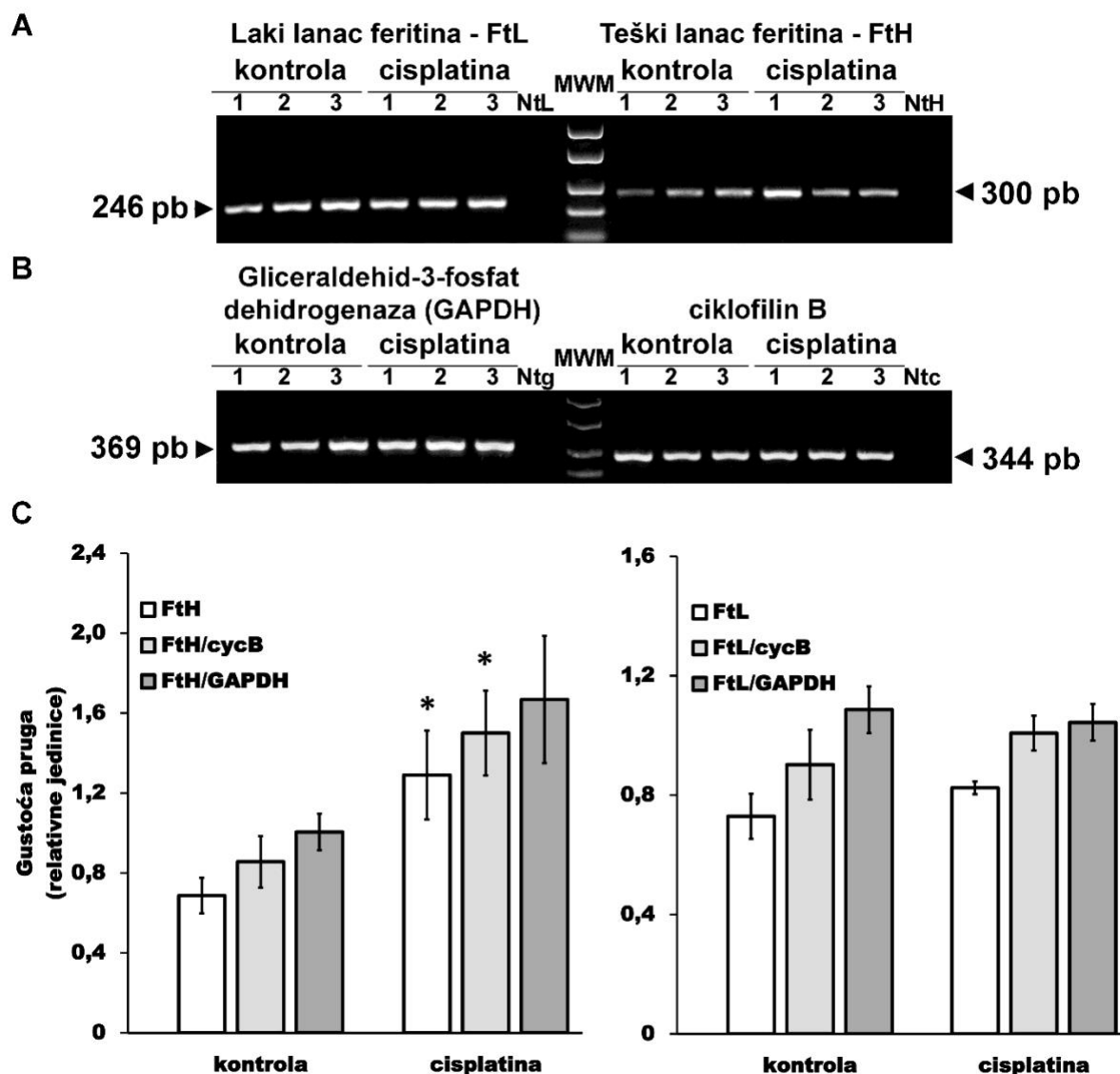
Za početnice koje sam *in silico* dizajnirala prethodno navedenim računalnim programima (Tablica 1), najprije sam odredila optimalan broj ciklusa PCR-a potrebnih za postizanje maksimalne ekspresije lakog i teškog lanca feritina u arhivskim cDNA uzorcima. Ovim pristupom dobiveni su optimalni uvjeti za eksperimentalne uzorke, procijenjena je učinkovitost

početnica te utvrđena prisutnost ekspresije lakog i teškog lanca feritina u bubregu kore (Slika 19.).

Daljnja analiza ekspresije mRNA provedena je na arhivskim uzorcima cDNA izoliranim isključivo iz kore bubrega kontrolnih životinja i životinja tretiranih cisplatinom 5 dana nakon obrade. Rezultati su prikazani na gelu, gdje su vidljivi mRNA bendovi za FtL i FtH, kao i mRNA bendovi za GAPDH i ciklofilin b, koji su korišteni kao referentni geni (*engl. housekeeping genes*). Grafički prikaz relativne ekspresije gena izveden je usporedbom gustoće RT-PCR pruga između kontrolnih i tretiranih uzoraka naspram referentnih gena (Slika 20.). Statistička obrada i izražavanje gustoće RT-PCR pruga provedeni su na temelju 3 replikata, uključujući po 3 uzorka iz svake od kontrolne i tretirane skupine.



**Slika 19.** Prikazani su rezultati određivanja optimalnog broja ciklusa nakon uzastopnog zaustavljanja „end-point“ RT-PCR reakcije u navedenim točkama. Nakon elektroforeze amplicona na agaroznom gelu optimum se pokazao 20 ciklusa za FtL i FtH, a 21 za produkte umnažanja „housekeeping“ ciklofilina b i GAPDH mRNA. U prikazanim prugama na različitom broju ciklusa RT-PCR reakcije amplificirani su produkti istovjetnog uzorka koji odgovaraju navedenim mRNA (ciljani gen). Prikazane su molekulska veličina markerima molekulske mase (*engl. DNA ladder, MWM*), te označeni broj ciklusa i pripadajuća veličina amplicona odnosno produkata umnažanja, pb (parovi baza).



**Slika 20.** Panel prikazuje rezultate end-point RT-PCR iz uzoraka mRNA ekspresije FtH i FtL naspram referentnih mRNA, GAPDH i cycB. Izolirane su mRNA samo iz kore bubrega i uspoređena je relativna ekspresija između kontrole i uzoraka nakon obrade cisplatinom 5. dan. A) slika agaroznog gela s ampliconima FtH (300 pb) i FtL (246 pb). B) ampliconi dva referentna, „housekeeping“ gena: glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) i ciklofilina b (cycB), u kontrolnih i uzorka nakon obrade cisplatinom 5. dan. C) Grafički prikaz usporedbe relativne ekspresije FtH i FtL između kontrole i uzoraka nakon obrade cisplatinom 5. dan za koji sam denzitometrijski mjerila gustoću RT-PCR pruga posebno te zatim i naspram ekspresije GAPDH (369 pb) i cycB (220 pb). Radila sam 2 gela (n=6 za obje skupine) i njihovim mjerenjima ustanovila statističku značajnost povećanja ekspresije FtH no ne i FtL. Statistička analiza provedena je studentovim t-testom uz značajnost od 95% (\*;  $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju provela sam analize kako bih istražila prisutnost i ekspresiju obje podjedinice feritina u bubrežnom/renalnom tkivu i promjene koje se događaju u uvjetima izazvanim cisplatinom peti dan nakon jednokratnog tretmana. Promjene u prisutnost i raspodjeli lakog (FtL) i teškog (FtH) lanca feritina u bubrezima štakora provela sam koristeći različite metode, uključujući western blot metodu, imunofluorescenciju i semi-kvantitativni, odnosno „end-point“ RT-PCR. Moji rezultati pružaju uvid u prisutnost mRNA i proteina i njihovu distribuciju/raspodjelu prije i nakon tretmana cisplatinom.

Western blot metoda pokazala je prisutnost teške i lake podjedinice feritina u svim ispitivanim dijelovima bubrega: korteksu, vanjskom sloju vanjske srži i unutarnjoj srži, no različite heterogene kvalitete (nije prikazano). Arhivski uzorci homogenata osim što su sublimirali i djelomično se isušili, pri tom su koagulirali i utjecali na multimerizaciju proteina u nerazgradljive gumaste smjese. Tako da smo nastavili rad samo na uzorcima iz kore kontrolnih (n=6) i tretiranih (n=6) životinja koji su se najbolje rehomogenizirali i dali reproducibilne rezultate. Identificirane proteinske pruge na 21kDa za FtH i 20kDa za FtL odgovaraju poznatim veličinama za navedeni teški i laki lanac feritina, što nadalje potvrđuje prisutnost obje podjedinice u bubrezima (Vulinović i sur. 2022). Obrada različitim uvjetima temperature uz i bez prisutnosti  $\beta$ -merkaptoetanol utjecala je na razdvajanje lanaca, što nam je ukazalo na optimalne uvjete za pripremu eksperimentalnih uzoraka. Ovi nalazi su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da feritin može mijenjati svoju konformaciju i stabilnost u različitim uvjetima (Slika 13.) (Arosio i Levi, 2010). Jasne razlike koje smo dobili između kontrolnih i uzoraka homogenata kore obrađenih cisplatinom (Slika 14.) pokazuju porast ekspresije obje podjedinice u našem semikroničnom pokusu jednokratnog tretmana većom dozom cisplatine te nakon žrtvovanja peti dan što je u skladu sa nedavnim rezultatima kronične obrade muških Wistar štakora nižom dozom (1 mg cisplatine/kg t.m., i.p.) i duže vrijeme (više tjedana) (Aggarwal i sur. 2022).

Prikaz imunofluorescencijskog obojenja pokazao je da su primarna antitijela protiv feritinskih lanaca specifično označila homogenu unutarstaničnu raspodjelu u epitelnim stanicama. Primarno u proksimalnim kanalićima (PK), uz iznimku FtH koji obilježava vjerojatno gustu pjegu (*macula densa*) i glavne stanice sabirnih kanalića sa sličnom te sugerira



da se teški lanac feritina nalazi u različitim strukturama unutar bubrega od lakog lanca feritina te ima i dodatne funkcije u metabolizmu stanica opisane u uvodu (Slika 15.). Međutim utvrđivanje promjena u navedenim dodatnim kanalicićima i strukturama, iako značajno i interesantno s obzirom na funkciju, izvan je opsega ovog rada. Opisano obojenje u kori bubrega (Slika 15. a i b) potvrdilo je specifičnost oba primarna protutijela i uspješnost primjene CY3 fluorofora za detekciju, te nadalje potvrdilo je i primarnu ekspresiju obje podjedinice feritina u kori bubrega (Vulinović i sur. 2022). Naime, najjače obojenje prisutno je u S1 i S2 odsječcima PK, dok je u S3 odsječku obojenje slabije za laki i za teški lanac feritina (Slika 15. a4 i b4). Razlike između kontrolnih regija kore i vanjskog tračka vanjske srži, koja je najviše zahvaćena toksičnim djelovanjem cisplatine prikazane su u dva panela (Slika 16. i 17.). U oba panela kora bubrega odnosno PK (Slika 16. A i B i Slika 17. A i B), pokazuju očuvanu raspodjelu i porast ekspresije i teške i lake podjedinice feritina nakon obrade cisplatinom peti dan (Slika 16. B i slika 17. B). U S3 odsječcima proksimalnih kanalica vanjskog tračka vanjske srži na odvojenim slikama panela (Slika 16. C i D i Slika 17. C i D), uočavamo jasnu razliku u strukturi i obojenju S3 odsječaka PK vanjskog tračka vanjske srži kontrolnih uzoraka koji pokazuju slabije homogeno obojenje uz mozaično poklopu stanicu jačeg intenziteta, dok s obje podjedinice feritina u uzorcima nakon obrade cisplatinom, dobivamo obojenje koje ističe jaka oštećenja i različit intenzitet obojenja od slabijeg do vrlo jakog u stanicama epitela koje su još djelomično očuvane ili su pak oljuštene iz kanalica u lumen (Slika 16. D i Slika 17. D). Imunohistokemijsko obojenje slaže se (Slika 16. i 17.) sa nalazima dobivenim western blot metodom (Slika 15.) i potvrđuje porast ekspresije obje podjedinice feritina, ali ipak uočljivije u kori sa FtL, kako na krio-sekcijama uzoraka obrađenih cisplatinom naspram kontrolnih uzoraka (Slika 16. i 17.) tako i u homogenatima kore bubrega (Slika 15.). Tek sam pri detaljnijoj analizi uočila moguće razlike i u vezikularnom obojenju prikazane slikom 18. Naime, iako prisutne u svim uzorcima obojenja s obje podjedinice feritina čini se da postoje razlike nakon obrade cisplatinom te ukazuju na moguće povećanu prisutnost vezikula (feritinofagiju i lizosomsku razgradnju) (Slika 18. B i D) te apikalno izlučivanje, egzocitozu iz epitelnih stanica već fiziološki primjećeno i obrađeno sa obojenjem metalotioneina (Sabolić i sur., 2018). Da li su to indikacije oksidativnog stresa pri ishemiji i reperfuziji ili učinak djelovanja cisplatine još treba istražiti.

Semikvantitativna RT-PCR metoda omogućila mi je određivanje relativne količine mRNA za laki i teški lanac feritina u kori bubrega kontrolnih i uzoraka obrađenih cisplatinom. Rezultati su pokazali prisutnost mRNA za oba lanca nakon određivanja uvjeta odnosno broja optimalnih

ciklusa za početnice s kojima raspoložem (Slika 19.), a razlike u ekspresiji između kontrolnih i cisplatinom tretiranih uzoraka ukazuju na isti smijer (Slika 20.) kao i western blot metoda (Slika 15.) te imunohistokemija (Slika 16. i 17.) odnosno na povećanje ekspresije mRNA obje podjedinice, premda je samo povećanje FtH statistički značajno. Očito je povećanje, odnosno promjena u regulaciji obje podjedinice feritina uslijed tretmana cisplatinom koje sam i kvantificirala naspram mRNA očuvane ekspresije referentnih gena (Slika 20. A, B, C).

Statistička obrada rezultata iz „end-point“ RT-PCR i western blot metode pokazuju da su rezultati dosljedni i uz heterogene rezultate za FtL, te značajni za FtH (Slika 15. B i Slika 20. C). Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju uloge feritina u renalnom tkivu i može poslužiti kao osnova za daljnje istraživanje utjecaja cisplatine na regulaciju željeza, feritina i funkciju bubrega. Važno je napomenuti da bi buduća istraživanja trebala uključivati veći broj uzoraka, cijeli bubreg i po mogućnosti oba spola kao i dodatne metode i analize mjerenja metala te oksidativnog stresa kako bi se potvrdili ovi rezultati i proširila njihova interpretacija.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju dobivenih rezultata, zaključila sam da tretman cisplatinom uzrokuje značajno povećanje u prisutnosti proteina i mRNA te promjenu u raspodjeli obje feritinske podjedinice

u epitelnim stanicama PK kore bubrega. Očekivana oštećenja u S3 odsječcima PK bubrega doprinjela su promjeni raspodjele obojanja obje podjedinice feritina koje je relativno povećano u vanjskom tračku vanjske srži. Promjene u ekspresiji, odnosno povećanje lakog i teškog lanca feritina, koje su potvrđene western blot metodom, te metodama imunohistokemije i semikvantitativnim RT-PCR, ukazale su da cisplatina vjerojatno izaziva oksidativni stres i u kanlicima koji nisu neposredno oštećeni, što može destabilizirati feritinske nanokaveze, dovodeći do potencijalno povećane mobilizacije željeza unutar stanica. Proces prema rezultatima imunohistokemije u kortikalnom dijelu bubrega gdje je ekspresija feritina najizraženija zbog povećanja broja i intenziteta pozitivno obojanih vezikula te njihove egzocitoze moguće ide preko feritinofagije i razgradnje u lizosomima te njihove regulirane ekstruzije iz PK kore dok se navedeno više ne odvija u S3 odsječcima PK bubrega već opterećenje egzosomima punim feritinom (i vjerojatno drugim komponentama citosola) biva dodatni čimbenik oštećenja i smrti tih stanica, pa možda i ferroptozom, jer se reapsorpcija i resinteza GSH najviše odvija u vanjskom tračku vanjske srži gdje se na apikalnoj membrani nalaze potrebni transporteri i enzimi za navedene procese.

## **7. LITERATURA**

- Aggarwal, A., Dinda, A.K., Mukhopadhyay, C.K. (2022).** Effect of Cisplatin on Renal Iron Homeostasis Components: Implication in Nephropathy. *ACS Omega*. 2022 7(32):27804-27817. doi: 10.1021/acsomega.1c06716.
- Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. (2014).** Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*, 19:164-74.
- Anderson, G. J. (2007).** Hemochromatosis: Insights from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) study. *Gastroenterology*, 133(5), 1437-1439.
- Anderson, G. J., & Frazer, D. M. (2017).** Current understanding of iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(Suppl 6), 1559S-1566S.
- Arosio, P., Elia, L., & Poli, M. (2015).** Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, 67(2), 95-102.
- Arosio, P., Elia, L., Poli, M., & Gozzelino, R. (2017).** Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, 69(6), 414-422.
- Arosio, P. & Levi, S. (2010).** Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*, 1800, 783-792.
- Barton, J. C., Acton, R. T., & Rivers, C. A. (2015).** Hemochromatosis: Current knowledge, future directions. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 55(2), 135-142.
- Biasiotto, G., Di Lorenzo, D., Archetti, S., Zanella, I. (2016).** Iron and Neurodegeneration: Is Ferritinophagy the Link?. *Mol Neurobiol*, 53, 5542-5574.
- Bou-Abdallah, F. (2010).** The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 719-731.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014).** Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Dev, S. & Babitt, J.L. (2017)** Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, S6-S20. doi: 10.1111/hdi.12542.

- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., & Lamprecht, M. R. (2012).** Ferroptosis: an iron-dependent form of non-apoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Fang, Y., Gao, T., Zhang, X., Chen, W., & Bai, Y. (2021).** Recent advances in the mechanisms of cisplatin resistance in lung cancer and insights for the development of targeted therapies. *Drug Resistance Updates*, 55, 100698.
- Fleming, R. E., & Ponka, P. (2012).** Iron overload in human disease. *The New England Journal of Medicine*, 366(4), 348-359.
- Ganz, T. (2013).** Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews*, 93(4), 1721-1741.
- Guyton & Hall (2011).** Textbook of medical physiology / John Hall. – 12th ed. by Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 25. poglavlje str.285.
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996a).** The structure and function of ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275(3), 161-203. doi:10.1016/0167-4838(96)00008-0.
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996b).** Interaction of copper with ferritin: A review. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1(2), 145-158. doi:10.1155/BICA/1996/26879.
- He, Y., & Zhang, L. (2016).** Regulation of ferritin expression by iron and oxidative stress. *Iron and Heme Proteins*, 1, 23-45.
- Hentze, M. W., & Kuhn, L. C. (1996).** Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 20875-20878. doi:10.1074/jbc.271.29.20875.
- Jiang, R., Murao, N., Yang, B., Li, J., Wang, Y., Wang, Z., ... & Zhang, Z. (2015).** Iron deposition and the tumour microenvironment. *Cancer Letters*, 370(2), 206-212.
- Kelland, L. R. (2007).** The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584. doi:10.1038/nrc2196.

**Kondaiah, P., Yaduvanshi, P.S., Sharp, P.A., Pullakhandam, R. (2019).** Iron and Zinc Homeostasis and Interactions: Does Enteric Zinc Excretion Cross-Talk with Intestinal Iron Absorption? *Nutrients*. 11(8):1885. doi:10.3390/nu11081885

**Kwak, M., Kim, S., & Lee, J. (1995).** Identification of a specific regulatory element for ferritin expression. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3137-3145. doi:10.1128/MCB.15.6.3137.

**Ljubojević, M. (2003).** Uzroci poliurije u cisplatinskoj nefrotoksičnosti u štakora, magistarski rad.

**Li, J., Cao, F., Yin, Hl. et al. (2020).** Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease* 11:88 doi:10.1038/s41419-020-2298-2

**Li, J., Jian, J., Li, X., Huang, X. (2017).** Mitochondria-independent ferroptosis regulated by iron-dependent hydroxyl radicals. *Cell Death & Differentiation*, 24(3), 504-514.

**Liu, X., & Wang, L. (2019).** Ferroptosis: A novel therapeutic target for cisplatin resistance. *Biochemical Pharmacology*, 162, 1-10.

**Ma, L., Wang, L., Nelson, A. T., Han, C., Li, W., & Zhang, J. (2018).** PCBP2, a new regulator of iron efflux in heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(3), 375-384.

**Miller, C., & Schumaker, V. (1991).** Regulation of ferritin synthesis in response to inflammatory cytokines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47(2), 122-132. doi:10.1002/jcb.240470204.

**Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., Reeves, W.B. (2010).** Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2(11):2490-518. doi: 10.3390/toxins2112490.

**Manohar, S., i Leung, N. (2017):** Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of nephrology*, 31(1), 15–25.

**Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., & Galy, B. (2017).** A red carpet for iron metabolism. *Cell*, 168(3), 344-361.

**Olivieri, N. F., & Brittenham, G. M. (2013).** Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood*, 122(24), 4011-4021.

**Ozkok, A., Edelstein, C. L. (2014).** Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *BioMed Research International*, vol. 2014, 967826

**Pantopoulos, K., Porwal, S.K., Tartakoff, A., Devireddy, L. (2012).** Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51:5705-5724.

**Sabolić, I., Škarica, M., Ljubojević, M., Breljak, D., Herak-Kramberger, C.M., Crljen, V., Ljubešić, N. (2018).** Expression and immunolocalization of metallothioneins MT1, MT2 and MT3 in rat nephron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 46:62-75. doi: 10.1016/j.jtemb.2017.11.011.

**Santambrogio, P., Luzzago, A., & Levi, S. (1992).** Characterization of hemosiderin and its relationship with ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 13706-13713. doi:10.1016

**Stockwell, B.R. (2022).** Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell*, J7;185(14):2401-2421. doi: 10.1016/j.cell.2022.06.003.

**Vanoaica, L., Darshan, D., Richman, L., Schümann, K., Kühn, L.C. (2010).** Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metabolism*, 12(3):273-82. doi: 10.1016/j.cmet.2010.08.003..

**Volarevic, V., Djokovic, B., Jankovic, M.G., Harrell, C.R., Fellabaum, C., Djonov, V., Arsenijevic, N. (2019).** Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *The Journal of Biomedical Science*, 26(1):25. doi: 10.1186/s12929-019-0518-9.

**Vulinović, M.P., Turčić, P., Micek, V., Ljubojević, M. (2022).** Light and heavy ferritin chain expression in the liver and kidneys of Wistar rats: aging, sex differences, and impact of gonadectomy. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 73(1):48-61. doi: 10.2478/aiht-2022-73-3621.

**Zhang, C., Xu, C., Gao, X., Yao, Q. (2022).** Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*. 7;12(5):2115-2132. doi: 10.7150/thno.69424.

**Wallace, D.F. (2016).** The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clinical Biochemist Reviews*, 37:51-62.

**Xie, T., Yao, L., Li, X. (2024).** Advance in Iron Metabolism, Oxidative Stress and Cellular Dysfunction in Experimental and Human Kidney Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 13(6):659. doi: 10.3390/antiox13060659.



## **8. ŽIVOTOPIS**

Zovem se Valentina Dolić, rođena sam 20. siječnja 1996. godine u Livnu, Bosna i Hercegovina, gdje sam uspješno završila osnovnu i srednju školu. Preddiplomski sveučilišni studij jednopredmetne Biologije završila sam na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti u Mostaru. Trenutačno sam studentica II. godine diplomskog studija, eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.