

# Ekspresija alfa podjedinice NaK-ATPaze u nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom

---

**Sudac, Daria**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:217:545515>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-21**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Daria Sudac

**Ekspresija alfa podjedinice NaK-ATPaze u  
nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Daria Sudac

**Expression of alpha subunit of NaK-ATPase  
in cisplatin nephrotoxicity**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za molekularnu toksikologiju na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod mentorstvom dr. sc. Marije Ljubojević, te komentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Ekspresija alfa podjedinice NaK-ATPaze u nefrotoksičnosti uzrokovanoj cisplatinom

Daria Sudac

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bubrezi su parni organi smješteni u trbušnoj šupljini i zaduženi za filtraciju krvi, izlučivanje štetnih tvari i općenito održavanje homeostaze unutrašnjeg okoliša tijela. Zbog njihove anatomije i funkcije podložni su oštećenjima uzrokovanim toksičnim spojevima uključujući okolišne kemikalije, metale i različite lijekove. Zbog važne funkcije u reapsorbiciji korisnih i sekreciji štetnih tvari proksimalni kanalić, pogotovo njegov S3 segment, osjetljiv je na različite ksenobiotike. Cisplatina je važan citostatik korišten za tretman različitih malignih tumora. Jedan od glavnih nedostataka cisplatine je njezina nefrotoksičnost. Kratkoročno, tretman cisplatine dovodi do akutnog zatajenja bubrega koje uzrokuje različite patofiziološke promjene. Dugoročno postoji mogućnost razvoja kronične bolesti bubrega (CKD), pri kojoj se funkcija bubrega progresivno smanjuje. Kod CKD uvijek je prisutna fibroza bubrega, za koju je karakteristična akumulacija i aktivacija fibroblasta i miofibroblasta. Poznato je da je proces epitelno-mezenhimske tranzicije uključen u nastanak fibroblasta iz epitelnih stanica tubula. U ovaj proces uključena je NaK ATPaza, proteinska pumpa zadužena za aktivni transport natrija i kalija suprotno kemijskom gradijentu. U ovom istraživanju sam pomoću metoda imunohistokemije i western blota pokazala da dolazi do smanjenja ekspresije alfa podjedinice NaK ATPaze na razini proteina kod štakora nakon jednokratnog tretmana cisplatinom. Također je vidljiva povećana ekspresija mRNA za isti protein, dobivena metodom RT-PCR.

Ključne riječi: proksimalni kanalić, fibroza, epitelno-mezenhimska tranzicija  
(54 stranica, 13 slika, 1 tablica, 25 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Marija Ljubojević  
Komentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:  
Prof. dr. sc. Domagoj Đikić  
Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić  
Izv. prof. dr. sc. Ivana Šola

Rad prihvaćen: 12. 01. 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Expression of alpha subunit of NaK-ATPase in cisplatin nephrotoxicity

Daria Sudac

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Kidneys are pair organs located in the abdominal cavity and they filter blood, excrete harmful substances and in general maintain the homeostasis of the body's internal environment. Because of their anatomy and function, they are susceptible to damage caused by toxic substances such as environmental chemicals, metals and various drugs. Due to its important function in reabsorption of useful and secretion of harmful substances the proximal tubule, especially in its S3 segment, kidneys are susceptible to damage by various xenobiotics. Cisplatin is an important cytostatic used for the treatment of various malignant tumors. One of the main disadvantages of cisplatin is its nephrotoxicity. In the short term, cisplatin treatment leads to acute renal failure that causes various pathophysiological changes. In the long term there is a possibility of developing chronic kidney disease (CKD), in which kidney function progressively decreases. Kidney fibrosis is always present in CKD, and it is characterized by the accumulation and activation of fibroblasts and myofibroblasts. It is known that the process of epithelial-mesenchymal transition is involved in the formation of fibroblasts from tubular epithelial cells. NaK ATPase, a protein pump responsible for the active transport of sodium and potassium against the chemical gradient, is involved in this process. Here, using immunohistochemistry and western blot methods, I showed that there is a decrease in the expression of the alpha subunit of NaK ATPase at the protein level in rats, after single treatment with cisplatin. Increased expression of mRNA for the same protein, obtained by the RT-PCR method, is also visible.

Keywords: proximal tubule, fibrosis, epithelial-mesenchymal transition  
(54 pages, 13 figures, 1 table, 25 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Marija Ljubojević  
Co-mentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Reviewers:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić  
Assoc. prof. dr. sc. Maja Matulić  
Assoc. prof. dr. sc. Ivana Šola

Thesis accepted: 12. 01. 2023.



# Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Bubreg.....	2
1.1.1.	Struktura bubrega.....	2
1.1.2.	Osjetljivost bubrega na toksične spojeve.....	6
1.2.	Natrij-kalij pumpa.....	9
1.2.1.	Struktura NaK ATPaze.....	9
1.2.2.	Funkcija NaK ATPaze.....	10
1.3.	Cisplatina.....	11
1.3.1.	Cisplatina – struktura i otkriće.....	11
1.3.2.	Ulazak u stanicu i aktivacija.....	12
1.3.3.	Reakcija cisplatine s proteinima.....	14
1.3.4.	Reakcija cisplatine sa nukleinskim kiselinama.....	14
1.4.	Nefrotoksičnost cisplatine.....	16
1.4.1.	Ulazak cisplatine u stanice nefrona.....	17
1.4.2.	Djelovanje cisplatine u stanici nefrona.....	19
1.4.3.	Cisplatina i akutno zatajenje bubrega.....	20
1.4.4.	Cisplatina i kronična bolest bubrega.....	21
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	23
3.	MATERIJALI I METODE.....	25
3.1.	Materijali.....	26
3.1.1.	Kemikalije i pribor.....	26
3.1.2.	Puferi i otopine.....	27
3.2.	Metode.....	28
3.2.1.	Pokusne životinje i tretman cisplatinom.....	28
3.2.2.	Protutijela.....	29
3.2.3.	Fiksiranje tkiva <i>in vivo</i> .....	29
3.2.4.	Tkivni naresci i posredna imunofluorescencija.....	30
3.2.5.	Izolacija ukupnih staničnih membrana iz pojedinih dijelova bubrega.....	31
3.2.6.	Određivanje koncentracije proteina.....	31



3.2.7. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) i western analiza.....	32
3.2.8. Densitometrija.....	33
3.2.9. Izolacija ukupne RNA.....	33
3.2.10. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR).....	34
3.2.11. Prikaz i statistička obrada podataka.....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Rezultati indirektna imunohistokemije na narecima fiksiranog tkiva bubrega.....	38
4.2. Analiza ekspresije proteina $\alpha$ 1-NaK ATPaze u bubregu nakon tretmana cisplatinom metodom western blot.....	41
4.3. Analiza relativne ekspresije mRNA $\alpha$ 1-NaK ATPaze kod tretmana cisplatinom dobivena metodom end-point RT-PCR-a.....	43
5. RASPRAVA.....	45
5.1. Usporedba ekspresije $\alpha$ 1-NaK ATPaze u stanicama bubrega tretiranih cisplatinom i kontrolnih bubrega .....	46
5.2. Ekspresija $\alpha$ 1-NaK ATPaze kroz vrijeme nakon tretmana cisplatinom.....	47
6. ZAKLJUČAK.....	49
7. LITERATURA.....	51

## Kratice

ARF – akutno zatajenje bubrega (*engl.* acute renal failure)

CKD – kronična boleost bubrega (*engl.* chronic kidney disease)

ECM – ekstracelularni matriks (*engl.* extracellular matrix)

EMT – epitelno-mezenhimska tranzicija (*engl.* epithelial-mesenchymal transition)

GFR – brzina glomerularne filtracije (*engl.* glomerular filtration rate)

gGT – gama-glutamil transferaza

GSH – glutation

MT – metalotionein (*engl.* metallothionein)

OAT – transporter organskih aniona (*engl.* organic anion transporter)

OCT – transporter organskih kationa (*engl.* organic cation transporter)

PAH – para-aminohipurna kiselina

RBF – bubrežni krvotok (*engl.* renal blood flow)

ROS – reaktivne kisikove vrste (*engl.* reactive oxygen species)

RPF – bubrežni protok plazme (*engl.* renal plasma flow)

USM – ukupne stanične membrane

UTVS – unutarnji tračak vanjske srži

VTVS – vanjski tračak vanjske srži

# **1.UVOD**

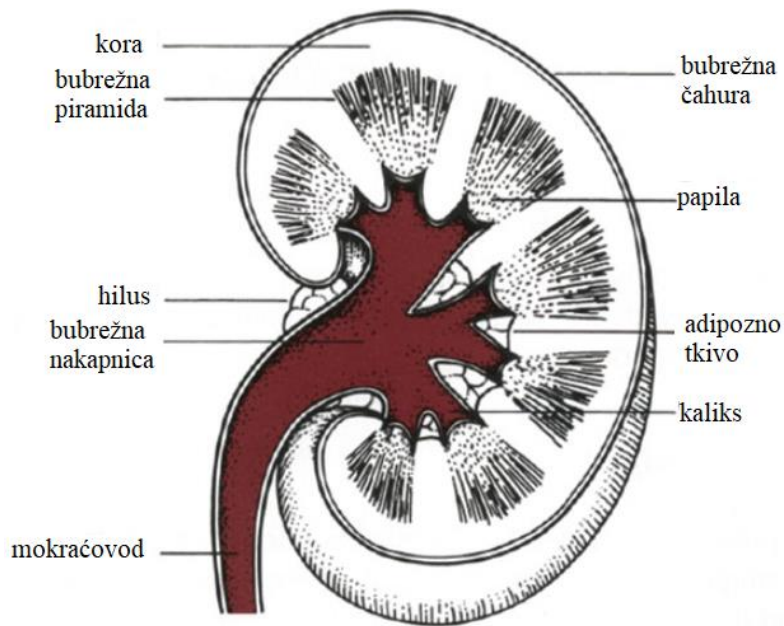
## **1.1. Bubrezi**

Bubrezi su parni organi smješteni u trbušnoj šupljini svaki s jedne strane kralježnice (Lote, 2012). Bubrezi imaju važnu funkciju u održavanju homeostaze organizma. Kod čovjeka bubrezi filtriraju do 180 litara krvi svaki dan. Filtracijom krvi izlučuju otpadne tvari, kontroliraju osmolarnost, volumen tekućine u tijelu, pH status i koncentraciju elektrolita. Uz to uključeni su u kontrolu krvnog tlaka pomoću sistema renin-angiotenzin-aldosteron, lučenje eritropoetina, koji stimulira stvaranje eritrocita u koštanoj srži i djeluju u aktivaciji vitamina D koji je važan za ravnotežu kalcija i fosfora u tijelu. Zbog ovih funkcija bubrezi imaju jednu od najvažnijih uloga u održavanju i kontroli unutarnjeg okoliša tijela (Yu i sur., 2019 i Lote, 2012).

### **1.1.1. Struktura bubrega**

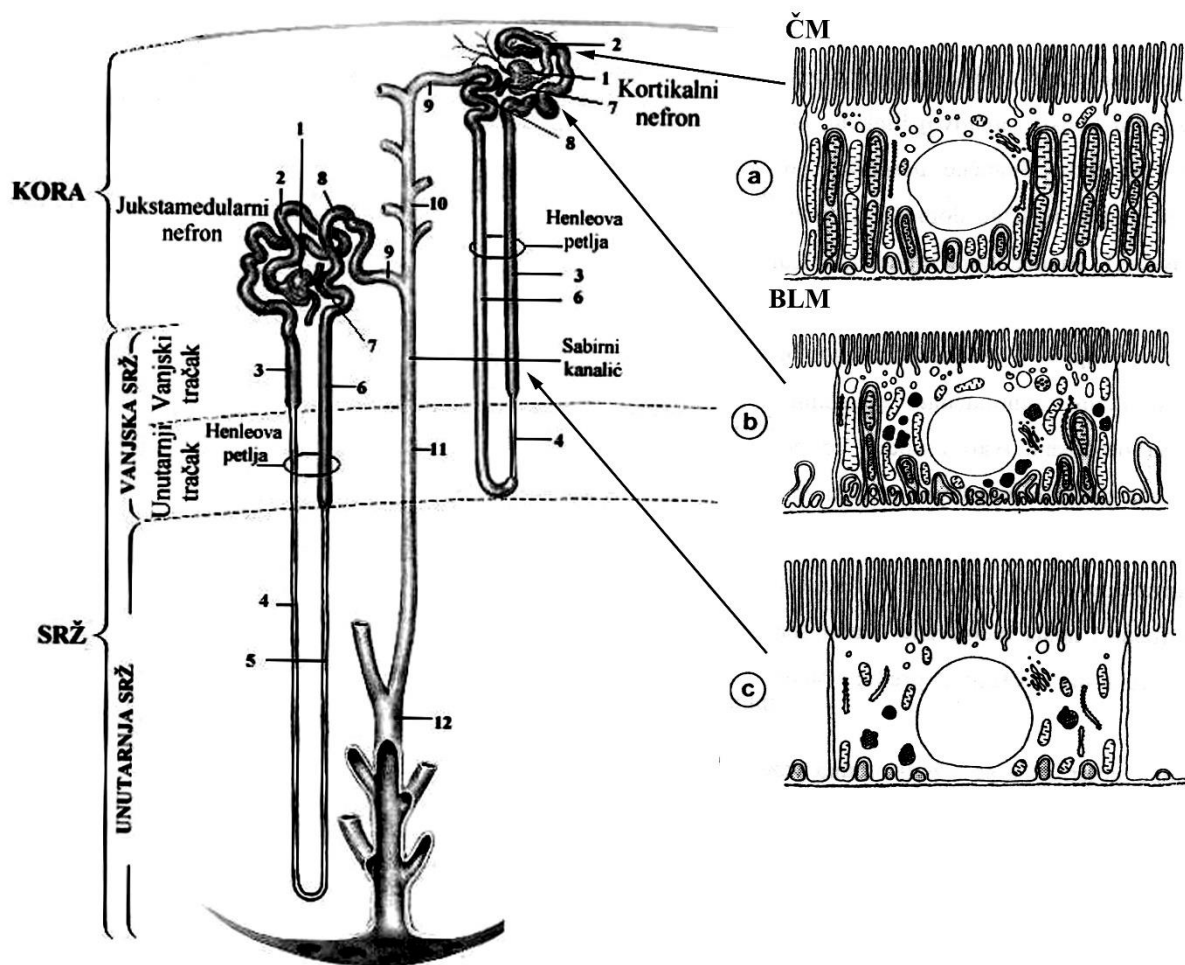
Bubreg je organ veličine šake i oblika zrna graha smješten iza potrbušnice. U središtu na konkavnoj strani svakog bubrega postoji otvor, hilus, kroz koji u bubreg ulazi renalna arterija i vene, limfne žile, renalni živac i bubrežna nakapnica u obliku lijevka koja čini gornji kraj mokraćovoda (Lote, 2012). Kod ljudi i viših sisavaca bubrezi imaju polipapilarnu strukturu, to jest srž bubrega je podijeljena na više bubrežnih piramida. Kod miševa i štakora, koje koristimo kao modelne organizme struktura bubrega je unipapilarna, dakle postoji samo jedna bubrežna piramida (Yu i sur., 2019).

Na longitudinalnom presjeku bubrega vide se dvije zone: tamnija kora i svjetlija srž. Kora bubrega mjesto je najveće reapsorpcije vode, elektrolita i otopljenih tvari iz glomerularnog filtrata u lumen zavijenih proksimalnih kanalića nefrona, te sekrecije štetnih organskih tvari iz kapilara vasa recte u lumen tubula (Kriz i Kaissling, 2008). Srž je podijeljena na više bubrežnih piramida, čiji vrhovi su okrenuti prema nakapnici čineći bubrežnu papilu. Na papilu svake piramide veže se kaliks koji povezuje piramidu i bubrežnu nakapnicu (Slika 1) (Lote, 2012).



**Slika 1.** Longitudinalni presjek kroz bubrežni organ s obilježenim glavnim strukturama. (Preuzeto i obrađeno prema radu Lote, 2012.)

Sama srž se sastoji od tri regije koje sadrže različite segmente nefrona: vanjski tračak vanjske srži (VTVS), unutarnji tračak vanjske srži (UTVS) i unutarnja srž. Vanjski tračak vanjske srži sadrži S3 segmente proksimalnih kanalića, ravne dijelove distalnih kanalića i sabirne kanaliće, dok unutarnji tračak vanjske srži sadrži tanke silazne i debele uzlazne krakove Henleovih petlji i sabirne kanaliće nefrona. Unutarnja srž sadrži tanke silazne i uzlazne kanaliće i sabirne kanaliće (Kriz i Kaissling, 2008) (Slika 2).



**Slika 2.** Shematski prikaz kortikalnog i jukstamedularnog nefrona i prikaz poprečnih prereza polarnih stanica iz 3 segmenta proksimalnog kanalića. Strukture nefrona prikazane na slici: 1 glomerul; 2 zavijeni proksimalni kanalić (pars convoluta) S1, S2 segmenti; 3 ravni proksimalni kanalić (pars recta), S3 segment; 4 tanki silazni krak Henleove petlje; 5 tanki uzlazni krak Henleove petlje; 6 debeli uzlazni krak Henleove petlje; 7 macula densa; 8 zavijeni distalni kanalić; 9 vezni kanalić; 10, 11, 12 sabirni kanalić kore, te vanjske i unutarnje srži. Prikaz poprečnih prereza: a) S1 segment, b) S2 segment, c) S3 segment proksimalnog kanalića. ČM – četkasta membrana, BLM – bazalna membrana (Preuzeto i obrađeno prema radu: Kriz i Kaissling, 2008.)

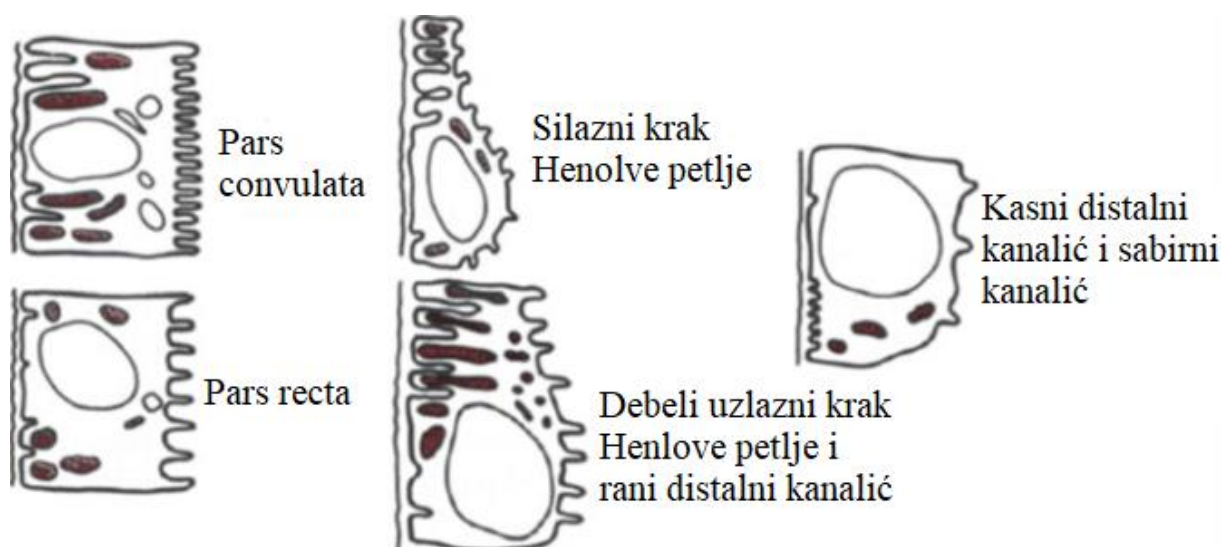
Osnovna funkcionalna jedinica bubrega je nefron. Nefron je dugačka cijev koja počinje Bowmanovom čahurom u kojoj je splet kapilara koji se naziva glomerul, na koju se nastavlja proksimalni kanalić, zatim Henleova petlja i na kraju distalni kanalić. Više distalnih kanalića udružuju se zajedno u sabirne kanaliće. Postoje dvije vrste nefrona ovisno o lokaciji glomerula i dužini Henleove petlje. Kortikalni nefroni imaju glomerul smješten u vanjske dvije trećine korteksa i imaju kratke Henleove petlje koje dopiru kratko u srž ili uopće ne dolaze do srži.

Druga vrsta su jukstamedularni nefroni kojima je glomerul smješten u unutarnjoj jednoj trećini kore i koji imaju dugačke Henleove petlje koje dopiru duboko u srž (Lote, 2012) (Slika 2).

Glomerul je splet kapilara unutar Bowmanove čahure koji služi stvaranju ultrafiltrata plazme koji ulazi u nefron. Glomerularne kapilare su granaju iz aferentne arteriole, od koje dobivaju krv i ponovno se skupljaju u eferentnu arteriolu (Lote, 2012).

Proksimalni kanalić čine 3 segmenta: S<sub>1</sub> koji čini zavijeni dio proksimalnog kanalića (pars convoluta), S<sub>2</sub> koji čini prijelazni dio između zavijenog i ravnog dijela kanalića i S<sub>3</sub> koji čini zadnji ravni dio (pars recta) proksimalnih kanalića prije nego što prelazi u Henleovu petlju (Schnellmann, 2013). Stanice S<sub>1</sub> segmenta su kubične/cilindrične i na granici s lumenom kanalića posjeduju mikrovile koji čine takozvanu četkastu membranu (*engl.* brush border). Mikrovili služe povećanju površine kako bi se mogla apsorbirati što veća količina tubularne tekućine. Također posjeduju udubljenja/nabore na bazolateralnoj membrani između kojih je veliki broj mitohondrija te dobro razvijen sustav lizosoma (Schnellmann, 2013 i Lote, 2012). Stanice S<sub>2</sub> segmenta kanalića imaju kraće mikrovile i nešto manje lizosoma i mitohondrija. Zadnji segment proksimalnog kanalića posjeduje dobro razvijenu četkastu membranu, bazolateralnu membranu s manje udubljenja/nabora nego segmenti S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> i manje mitohondrija i lizosoma (Schnellmann, 2013) (Slika 3).

Henleova petlja počinje na prelasku iz debljih S<sub>3</sub> stanica proksimalnih kanalića u tanje stanice međusobno povezane različitom jačinom. Stanice Henleove petlje su tanke i pločaste. Stanice imaju kompleksne rubove, čvrsto pristaju zajedno i posjeduju malo mikrovila. Tanki uzlazni krak Henleove petlje je strukturno sličan silaznom kraku, no imaju razlike u permeabilnosti i aktivnom prijenosu tvari. Debeli uzlazni krak ima stanice sličnog oblika i veličine je kao proksimalni kanalić, ali bez četkaste membrane (Lote, 2012) (Slika 3).



**Slika 3.** Prikaz morfolologije stanica različitih segmenata nefrona. Bazalna membrana je s lijeve strane, s desne strane je lumen kanalića. (Preuzeto i obrađeno prema radu Lote 2012.)

Na Henleovu petlju nastavlja se distalni kanalić. Ne postoje veće strukturne razlike između debelog uzlaznog kraka Henleove petlje i ranog distalnog kanalića, međutim razlike u sekreciji i reapsorpciji su na nivou prijenosnika koji se specifično eksprimiraju u svakom odsječku. Kasni distalni kanalić je strukturno sličan sabirnom kanaliću sa interkaliranim (umetnutim) stanicama koje reguliraju zakiseljavanje urina. Stanice u distalnom kanaliću imaju nabore na bazalnoj membrani. Kod ranog distalnog kanalića nabori su dublji i ponekad okružuju mitohondrije, dok su kod kasnog distalnog kanalića nabori plići i bez mitohondrija (Slika 3). Ove stanice imaju jaku NaK ATPazu aktivnost na bazalnoj membrani. Interkalirane stanice nemaju nabore na bazalnoj membrani i imaju malu NaK ATPazu aktivnost. Također imaju citoplazmatska produženja (mikrovile) na lumenalnoj membrani i visoku aktivnost vakuolarne ATPaze i ugljikove anhidraze (Lote, 2012).

Stanice u sabirnim kanalićima su kubične i sadrže manje zrnatu citoplazmu od onih u proksimalnim kanalićima. Na jedan sabirni kanalić vezano je oko šest tubula. Sabirni kanalić je vezan na kaliks u koji se skuplja mokraća (Lote, 2012).

### 1.1.2. Osjetljivost bubrega na toksične spojeve

Bubreg je zbog svoje anatomije i fiziologije posebno osjetljiv na toksične spojeve. Postoji veliki broj nefrotoksičnih spojeva među kojima su okolišne kemikalije, metali i različitih lijekovi. Postoji nekoliko kategorija lijekova koje imaju nefrotoksičnost kao



prepoznatu nuspojavu: antibiotici, inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima i blokatori angiotenzinskih receptora, analgetici i nesteroidni protuupalni lijekovi, radiokontrastni mediji i protutumorski lijekovi (Schnellmann, 2013).

S obzirom na relativno malu masu (0,5% mase tijela) kroz bubrege prolazi velika količina krvi (20-25% mirujućeg srčanog minutnog volumena) što ima posljedicu da potencijalne toksične tvari dolaze do bubrega u relativno velikim količinama. Uz to proces stvaranja urina uključuje koncentriranje tvari u kanalčićima nefrona čime spojevi koji nisu toksični u plazmi mogu biti štetni stanicama bubrega zbog više koncentracije. Zbog više koncentracije u intratubularnoj tekućini manje topive tvari također mogu precipitirati i stvarati blokade (Schnellmann, 2013).

Faktor koji može utjecati na pojavu i stupanj nefrotoksičnosti je osjetljivost bubrega na vazoaktivne tvari. U normalnim uvjetima vazokonstriktorski spojevi, kao što su angiotenzin II i vazopresin, i vazodilatorski spojevi, koji uključuju različite prostaglandine, su u ravnoteži i zajedno održavaju bubrežni krvotok (*engl.* renal blood flow, RBF) i brzinu glomerularne filtracije (*engl.* glomerular filtration rate, GFR). Tvari koje utječu na količinu vazoaktivnih spojeva, bilo u korist vazokonstrikcije ili vazodilacije, utječu na GFR i mogu dovesti do akutne ozljede bubrega (Schnellmann, 2013).

Većina nefrotoksičnih spojeva ima najveći efekt na određenom segmentu nefrona. Postoji više kompleksnih razloga za osjetljivost svakog segmenta na određene tvari, među kojima su: razlike u protoku krvi, prijenos i zadržavanje toksičnih supstanci, mehanizmi popravka i regeneracije, fiziološke i kemijske karakteristike epitela, ravnoteža između bioaktivacijskih i detoksifikacijskih reakcija i mnogo drugih razloga (Schnellmann, 2013).

Glomerul je prvo mjesto u nefronu koje dolazi u kontakt s nefrotoksičnim spojevima, mnogi od kojih mogu uzrokovati strukturne promjene u stanicama glomerula što dovodi do promjene permeabilnosti za proteine i proteinurije. Glomerul je također dio nefrona najosjetljiviji na ozljedu uzrokovanu imunskim sustavom. Do takvih ozljeda može doći ako se u glomerulu zadržavaju kemikalije na koje reagira imunski sustav, zbog čega dolazi do nakupljanja komponenata komplementa, neutrofila i makrofaga, fagocitoze i povećane količine citokina i reaktivnih kisikovih vrsta (*engl.* reactive oxygen species, ROS) (Schnellmann, 2013).

Proksimalni kanalčić je najčešće mjesto na kojemu dolazi do oštećenja uzrokovanih nefrotoksičnim tvarima. Jedan od razloga je veliko nakupljanje ksenobiotika u stanicama proksimalnog kanalčića zbog propustljivog epitela koji dopušta ulazak spojeva u unutrašnjost

stanice. Uz to, proksimalni kanalić je mjesto nefrona s najizraženijim prijenosom organskih aniona i kationa, teških metala, konjugata glutationa (engl. glutathione, GSH), peptida i proteina niske molekularne mase u stanicu. Razlike u prijenosu i nakupljanju u ovom segmentu nefrona glavni su razlozi za nastanak i razvoj oštećenja uzrokovanih teškim metalima, okolišnim kemikalijama i sljedećim lijekovima: aminoglikozidima,  $\beta$ -laktamskim antibioticima i cisplatinom (Schnellmann, 2013).

Uz korelaciju između prijenosa i nakupljanja toksičnih tvari i oštećenja, postoje i drugi čimbenici koji određuju mjesto nastanka ozljede. Cefaloridin, jedan od antibiotika u skupini cefalosporina, ima primarno mjesto prijenosa u S2 segmentu proksimalnog kanalića i to je također mjesto njegovog nefrotoksičnog djelovanja. S druge strane, dva različita antibiotika iz iste grupe imaju sličnu koncentraciju u bubrežnoj kori, no cefaloglicin ima puno jaču nefrotoksičnu aktivnost od relativno netoksičnog cefaleksina. Prema ovome prijenos i nakupljanje toksikanta u stanice je nužna, ali nije dovoljna za razvoj oštećenja. Nefrotoksičnost lijekova ovisi i o njihovim interakcijama s ciljnim molekulama u stanici (Schnellmann, 2013).

Osim razlika u prijenosu, različita osjetljivost određenih segmenata na nefrotoksične spojeve ovisi i o razlikama u aktivnosti citokroma P450 i cistein konjugat  $\beta$ -liaze. Ovi enzimi lokalizirani su najviše u proksimalnom kanaliću, dok je u ostalim dijelovima nefrona njihova aktivnost zanemarivo mala. Spojevi koji zahtijevaju bioaktivaciju kako bi postali citotoksični stvaraju najveća oštećenja upravo u proksimalnom kanaliću (Schnellmann, 2013).

Proksimalni kanalić je također osjetljiv na nedostatak kisika odnosno ishemijska oštećenja, tako da spojevi koji utječu na bubrežni krvotok, mitohondrijske funkcije i energetiku stanice će primarno oštećivati stanice u ovome segmentu (Schnellmann, 2013).

Henleova petlja i distalni dijelovi nefrona pokazuju manju sklonost kemijski uzrokovanim ozljedama. Većina ozljeda u ovom dijelu nefrona povezana je sa smanjenom mogućnošću koncentriranja urina (Schnellmann, 2013).

Ozljede papile najviše su povezane s prekomjernom uporabom analgetika. Oštećenja su najprije vidljiva na intersticijskim stanicama, a kasnije i na kapilarama i dijelovima nefrona u papili (Schnellmann, 2013).

## 1.2. Natrij-kalij pumpa

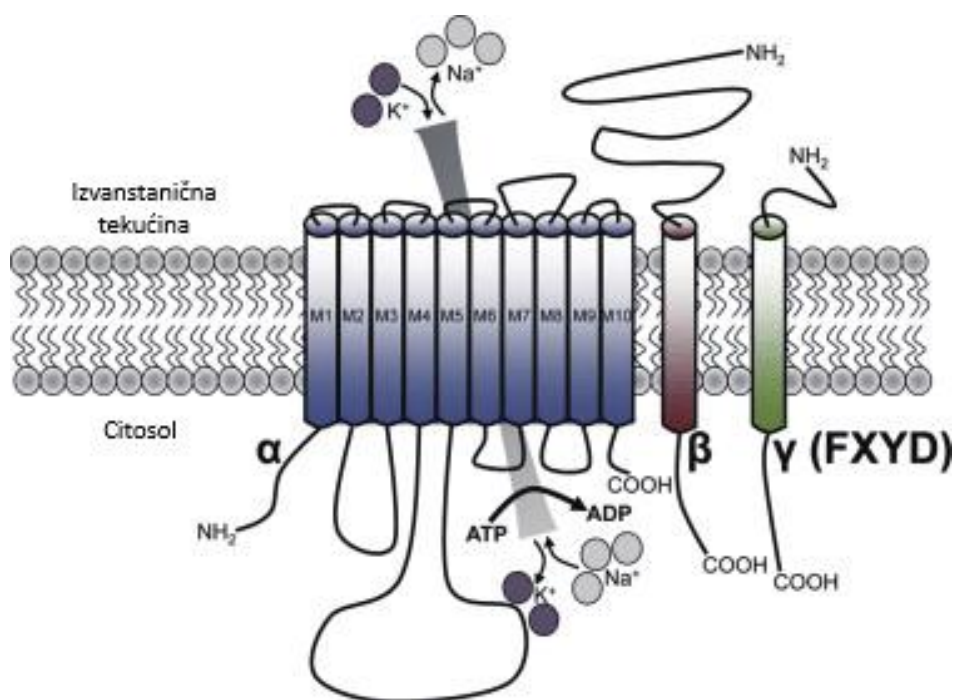
Natrij-kalij pumpa, odnosno  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaza, transmembranska je ATPaza prisutna u staničnim membranama životinjskih stanica. Sudjeluje u primarnom aktivnom prijenosu iona natrija i kalija između citosola i izvanstanične tekućine suprotno njihovoj koncentracijskom gradijentu (Pirahanchi i sur., 2022).

### 1.2.1. Struktura NaK ATPaze

Natrij-kalij pumpa sastoji se od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice. Osim te dvije podjedinice koje skupa djeluju kao funkcionalna pumpa može se pojavljivati i treća, tkivno specifična  $\gamma$  podjedinica, koja se još naziva i podjedinica FXFD (Slika 4). Do danas razriješena je struktura samo transmembranske regije  $\gamma$  podjedinice i njezine funkcije nisu potpuno jasne (Pirahanchi i sur., 2022).

Alfa podjedinica je katalitička podjedinica koja se sastoji od 3 citosolne domene i transmembranske regije koju čini 10 proteinskih alfa helikalnih uzvojnica (M1 – M10). Citosolne domene su: domena za vezanje nukleotida (N), fosforilacijska domena (P) i aktuatorna domena (A) koje djeluju kao kinaza, supstrat i fosfataza pri reakciji hidrolize ATP-a (Clausen i sur., 2017). Transmembranska regija može biti u dva konformacijska stanja: E1 i E2. Pri E1 stanju postoje tri mjesta za vezanje  $\text{Na}^+$ , dok u E2 stanju postoje dva vezna mjesta za  $\text{K}^+$  (Pirahanchi i sur., 2022). Konzervirani aspartat u P domeni je fosforiliran i defosforiliran tijekom katalitičkog ciklusa hidrolize ATP-a, što uzrokuje pomicanje citosolnih domena i promjene konformacije transmembranske regije (Clausen i sur., 2017).

Beta podjedinica je dio funkcionalne cjeline same pumpe zajedno s alfa podjedinicom i ključna je za transport pumpe do svog mjesta na plazma membrani. Sastoji se od N-terminalne unutarstanične domene, transmembranske proteinske alfa helikalne uzvojnice i duže C-terminalne izvanstanične domene. Izvanstanična domena ima nekoliko mjesta koja su glikozilirana (Clausen i sur., 2017).



**Slika 4.** Shematski prikaz strukture podjedinica  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (FXYP) NaK ATPaze. (Preuzeto iz rada Bøttger, 2012.)

### 1.2.2. Funkcija NaK ATPaze

Natrij-kalij ATPaza djeluje tako da za svaku molekulu hidroliziranog ATP-a izbacuje iz stanice 3 iona  $\text{Na}^+$  i unosi u stanicu 2 iona  $\text{K}^+$ . Glavna funkcija NaK ATPaze je održavanje membranskog potencijala i osmotske ravnoteže stanice. Pomoću NaK ATPaze održava se visoka koncentracija iona natrija izvan stanice i visoka koncentracija iona kalija unutar stanice, što je od velike važnosti za mnoge fiziološke procese organa te također za održavanje membranskog potencijala stanice u mirovanju, regulaciju volumena stanice i prijenos staničnih signala. Uz to održavanje koncentracijskog gradijenta omogućava sekundarni i tercijarni aktivni prijenos molekula preko stanične membrane ovisno o  $\text{Na}^+$  (Pirahanchi i sur., 2022).

Aktivnost NaK ATPaze neophodna je za funkciju velikog broja organskih i transportnih sustava. U živčanom sustavu stvara gradijent natrijevih i kalijevih iona potreban za nastanak akcijskog potencijala. Također kod astrocita je gradijent natrija važan kao pokretač sekundarnog aktivnog prijenosa kojim u stanice ulaze neurotransmiteri (Pirahanchi i sur., 2022).

Spermiji posjeduju posebnu izoformu NaK ATPaze koja je potrebna za plodnost. Uključena je u održavanje membranskog potencijala i iona u stanici koji su ključni za pokretnost i akrosomsku reakciju kod spermija (Pirahanchi i sur., 2022).

U bubregu NaK ATPaza je visoko eksprimirana i ima ključnu ulogu u glavnim funkcijama bubrega. Bubrež koristi gradijent natrija za reapsorpciju tijelu korisnih nutrijenata iz primarnog urina kao glukoze i aminokiselina, regulaciju drugih elektrolita i razine pH (Clausen i sur., 2017).

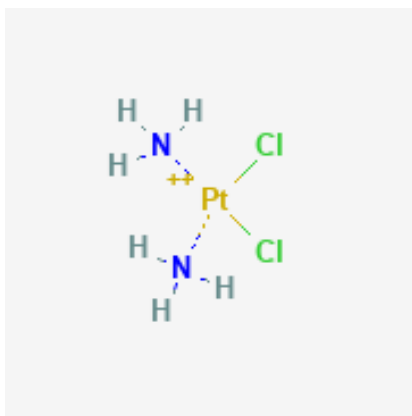
Osim funkcije u prijenosu pronađeno je da NaK ATPaza također ima funkciju u održavanju dobro diferenciranog polarnog fenotipa epitelnih stanica kod sisavaca. Inhibicija njezine funkcije ometa strukturu i funkciju čvrstih veza (*engl.* tight junctions) između stanica jednoslojnog epitela i sprječava polarizaciju stanice. Također je pokazano da  $\beta_1$  podjedinica ima funkciju kao adhezijska molekula između polariziranih epitelnih stanica (Rajasekaran i sur., 2010).

### **1.3. Cisplatina**

Cisplatina (*cis*-diaminodikloroplatina (II)) je citostatik koji se koristi za tretiranje različitih malignih tumora, najčešće solidnih tumora testisa i ovarija, no koristi se i za druga oboljenja kao što su rak glave i vrata, mjehura, jednjaka i karcinom malih stanica pluća (Ghosh, 2019).

#### **1.3.1. Cisplatina – struktura i otkriće**

Cisplatina je planarni koordinacijski kompleks platine(II) koji se sastoji od dvije amonijeve i dvije kloridne skupine koje su u *cis* orijentaciji (Slika 5). Spoj je neutralnog naboja. Amonijeve skupine čvrsto su vezane u kompleks dok se kloridne skupine lako mogu supstituirati nukleofilima (Kartalou i Essigmann, 2001).



**Slika 5.** Prikaz 2D molekularne strukture cisplatine. (Preuzeto s PubChem, 2004.)

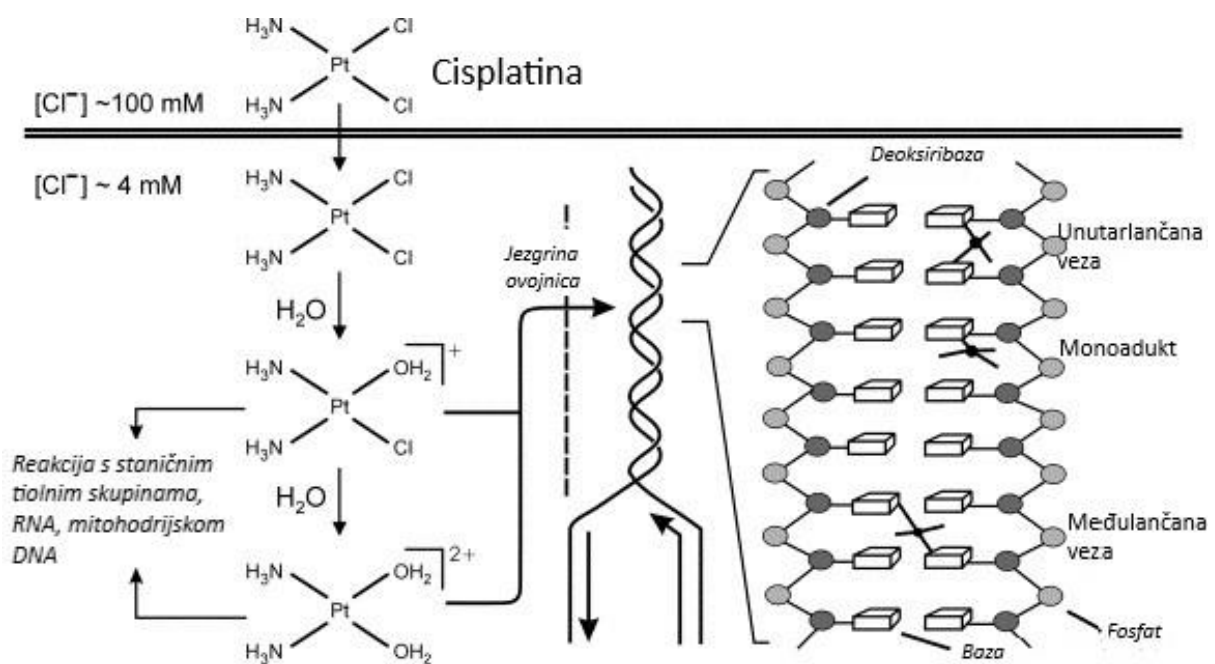
U vodenim otopinama kloridni ioni disociraju iz kompleksa i zamjenjuju ih voda ili hidroksidni ioni. Ravnoteža nehidroliziranih, djelomično i potpuno hidroliziranih platinskih kompleksa uvelike ovisi o koncentraciji kloridnih iona u otopini i pri visokim koncentracijama prevladava nehidrolizirani oblik (Kartalou i Essigmann, 2001).

Cisplatinu je otkrio Michele Peyrone 1845. god., no njezino protutumorsko djelovanje otkriveno je tek 1965. god. Barnett Roseberg istraživao je djelovanje električnog polja na rast bakterije *Escherichia coli* uz pomoć inertnih platinskih elektroda. Tijekom istraživanja došlo je do prestanka diobe bakterija i izduživanja stanica (promjena morfologije). Daljnji pokusi doveli su do zaključka da nastaju *cis* i *trans* izomeri diaminodikloroplatine(II) reakcijom platinskih elektroda i medija s amonijevim kloridom. Protutumorsko djelovanje cisplatine pokazano je 1969. god., prvo kod sarkoma 180 i leukemije L1210 kod miševa i kasnije na različitim drugim životinjskim modelima. Ubrzo nakon toga počela su pretklinička testiranja i cisplatina je bila 1978. godine odobrena kao tretman za testikularni i ovarijski rak od strane Agencije za hranu i lijekove SAD-a (*engl.* US Food and Drug Administration, FDA). Sljedeće godine Ujedinjeno Kraljevstvo također je odobrilo ovaj tretman (Ghosh, 2019).

### 1.3.2. Ulazak u stanicu i aktivacija

Tretman cisplatinom daje se pacijentima intravenski kao sterilna otopina. Većina cisplatine veže se za proteine plazme i pošto je koncentracija kloridnih iona u krvi visoka, oko 100 mM, cisplatina ostaje u svom neaktivnom, nehidroliziranom obliku dok je u krvotoku (Ghosh, 2019).

Točan mehanizam ulaska cisplatine u stanicu nije poznat. Pretpostavlja se da oko 50% ulazi pasivnom fuzijom kroz membranu. Cisplatina je mala, nenabijena molekula pa može proći plazma membranu pasivnom difuzijom, makar je brzina prolaska niska zbog njezine hidrofilnosti. Ostatak cisplatine ulazi najvjerojatnije preko prijenosnika organskih kationa (*engl.* organic cation transporter, OCT) i putem prijenosnika metala kao npr. transportera bakra (Crt1). Nakon ulaska u stanicu zbog relativno male koncentracije kloridnih iona u stanici (oko 4-20 mM) cisplatina se aktivira zamjenom kloridnog liganda za vodu. Tako aktivirana cisplatina je snažan elektrofil i može reagirati s velikim brojem nukleofila u stanici kao što su sulfhidrilne (-SH) skupine proteina i atomi dušika u nukleinskim kiselinama (Ghosh, 2019) (Slika 6).



**Slika 6.** Ulazak cisplatine u stanicu, njezina aktivacija i reakcija s proteinima i nukleinskim kiselinama u stanici. (Preuzeto i obrađeno prema radu Kartalou i Essigmann, 2001.)

Cisplatina u stanici stvara razne ROS-ove među kojima su hidroksilni radikali i superoksidi, što uzrokuje oksidativni stres u stanicama. Oksidativni stres utječe na stanicu preko peroksidacije membrana, vezanja sulfhidrilnih skupina proteina, mijenjanja signalnih puteva u stanici, što u konačnosti dovodi do apoptoze. Najvažnija meta ROS-ova je mitohondrij, koji zbog oštećenja mtDNA i povećane propusnosti mitohondrijske membrane puca i čime započinje citokrom c/prokaspaza-9 put apoptoze (Ghosh, 2019).

### 1.3.3. Reakcija cisplatine s proteinima

Cisplatina se veže za -SH skupine aminokiselina, prvenstveno na glutation, koji sudjeluje u kontroli redoks ravnoteže stanice i obrani od oksidativnog stresa. Glutation je najzastupljeniji neesencijalni tripeptid sa -SH skupinom u stanici. Vezanjem s cisplatinom nastaje spoj bis-glutation-platina koji inhibira sintezu proteina i ometa ostale funkcije GSH u stanici (Ishikawa i Ali-Osman, 1993).

Drugi protein na koji se često veže cisplatina je metalotionein (*engl.* metallothionein, MT) koji je bogat cisteinom koji sadrži -SH grupu. Smatra se da MT ima ulogu u detoksikaciji teških metala i održavanju homeostaze bakra i cinka u stanici. Također postoje dokazi da sudjeluje u odgovoru na oksidacijski stres i regulaciji transkripcije nakon staničnog stresa. Štiti stanicu tako da veže na sebe 7-10 atoma platine po molekuli MT-a i ima veći afinitet vezanja platine od glutaciona (Chu, 1994).

Osim na proteine uključene u obranu od oksidacijskog stresa, cisplatina se može vezati i na citoskeletne proteine: mikrotubule i aktinske niti. Cisplatina se u proteinima obično veže na tiolnu skupinu u aminokiselinama cisteinu i metioninu i na dušik u heterocikličnom prstenu histidina. No, u istraživanjima *in vitro*, kod mikrotubula je pokazano vezanje cisplatine na gvaninsku bazu GTP-a. Ovo vezanje analogno je vezanju cisplatine na DNA i utječe na polimerizaciju i depolimerizaciju mikrotubula, koja ovisi o vezanju GTP-a na  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice i GTPaznoj aktivnosti  $\beta$  podjedinice. Uočeno je da *in vitro* cisplatina stabilizira postojeće polimere i inhibira nastanak novih mikrotubula. Poremećaji strukture mikrotubula vezani su za signale koji vode stanicu u apoptozu (Tulub i Stefanov, 2001).

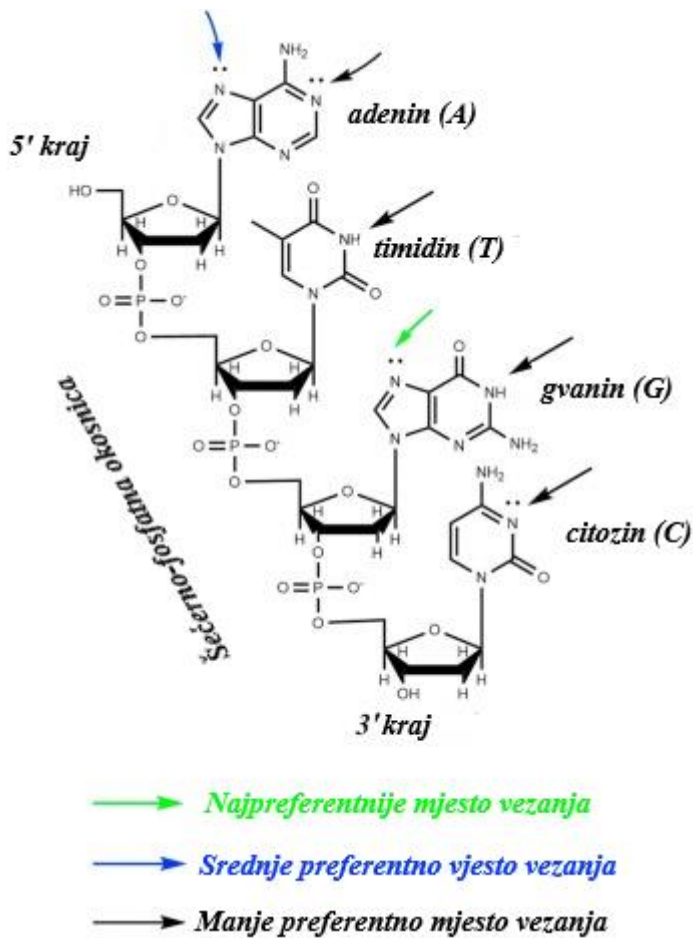
Također je pokazana mogućnost da aktin, koji veže ATP i ima ATPaznu aktivnost, ima ulogu u nastanku poremećaja uzrokovanih cisplatinom. Promjena u strukturi aktinskih vlakana mogla bi biti direktan odgovor na stanični stres uzorkovan cisplatinom. Bilo kakve promjene u citoskeletu stanice mogu doprinosti toksičnosti cisplatine (van der Water i sur., 2000).

### 1.3.4. Reakcija cisplatine s nukleinskim kiselinama

Glavna antitumorska aktivnost cisplatine je vezanje na nukleofilne baze nukleinskih kiselina, prvenstveno DNA. U studijama *in vitro* pokazano je da je pozicija N7 gvanina najčešće

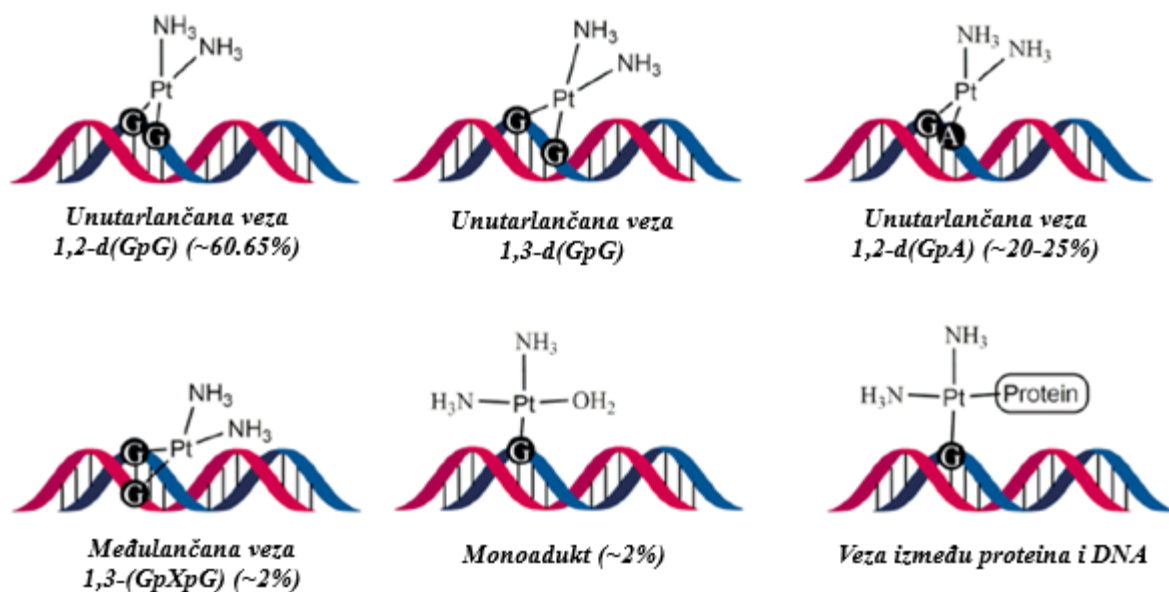


vezno mjesto cisplatine, no može se vezati i za N7 poziciju na adeninu. Najmanja mogućnost vezanja je za baze timidin i citozin (Ghosh, 2019) (Slika 7).



**Slika 7.** Prikaz veznih mjesta cisplatine na molekuli DNA i preferentnost vezenja cisplatine na njih. (Preuzeto i obrađeno prema radu Ghosh, 2019.)

Cisplatina može stvarati različite adukte s DNA; monoadukte, unutarlančane i međulančane veze. Najčešće su unutarlančane veze (90-95%), kod kojih su obično povezana dva uzastopna gvanina (1,2-d(GpG)) ili gvanin i adenin (1,2-d(ApG)) (Slika 8). Smatra se da citotoksičnosti najviše doprinose 1,2-unutarlančane veze (Ghosh, 2019).



**Slika 8.** Različite vrste adukata dobivene vezanjem cisplatine na DNA uzvojnici. (Preuzeto i obrađeno prema radu Ghosh, 2019.)

Vežanje cisplatine na DNA mijenja strukturu uzvojnice, dolazi do savijanja i odvajanja lanaca koji prepoznaju proteini s domenom HMG (*engl.* high mobility group). Protein HMG1 veže se za 1,2-cisplatina-DNA adukt i štiti ga od proteina uključenih u popravak oštećenja izrezivanjem nukleotida (*engl.* nucleotide excision repair, NER). Nemogućnost popravka adukta potiče signal za apoptozu (Kartalou i Essigmann, 2001).

Uz ovo, cisplatina također utječe na transkripciju. Uzvodni vezujući faktor (*engl.* upstream binding factor, UBF) ima povećani afinitet za cisplatinska oštećenja u jezgri, čime se zaustavlja transkripcija RNA pomoću polimeraze I, odnosno sinteza ribosomske RNA. Pretpostavlja se da je ovo jedan od razloga smanjenja sinteze proteina koje se pojavljuje kod djelovanja cisplatine (Kartalou i Essigmann, 2001).

#### 1.4. Nefrotoksičnost cisplatine

Jedan od nedostataka liječenja cisplatinom je toksičnost za druge organe i organske sustave kao što su bubrezi, jetra, reproduktivni organi, slušni aparat, imunosni sustav i živčani sustav. Također tretman cisplatinom može uzrokovati gastrointestinalne probleme i anemiju. Od svih nuspojava najizraženija je nefrotoksičnost (Ghosh, 2019).

#### 1.4.1. Ulazak cisplatine u stanice nefrona

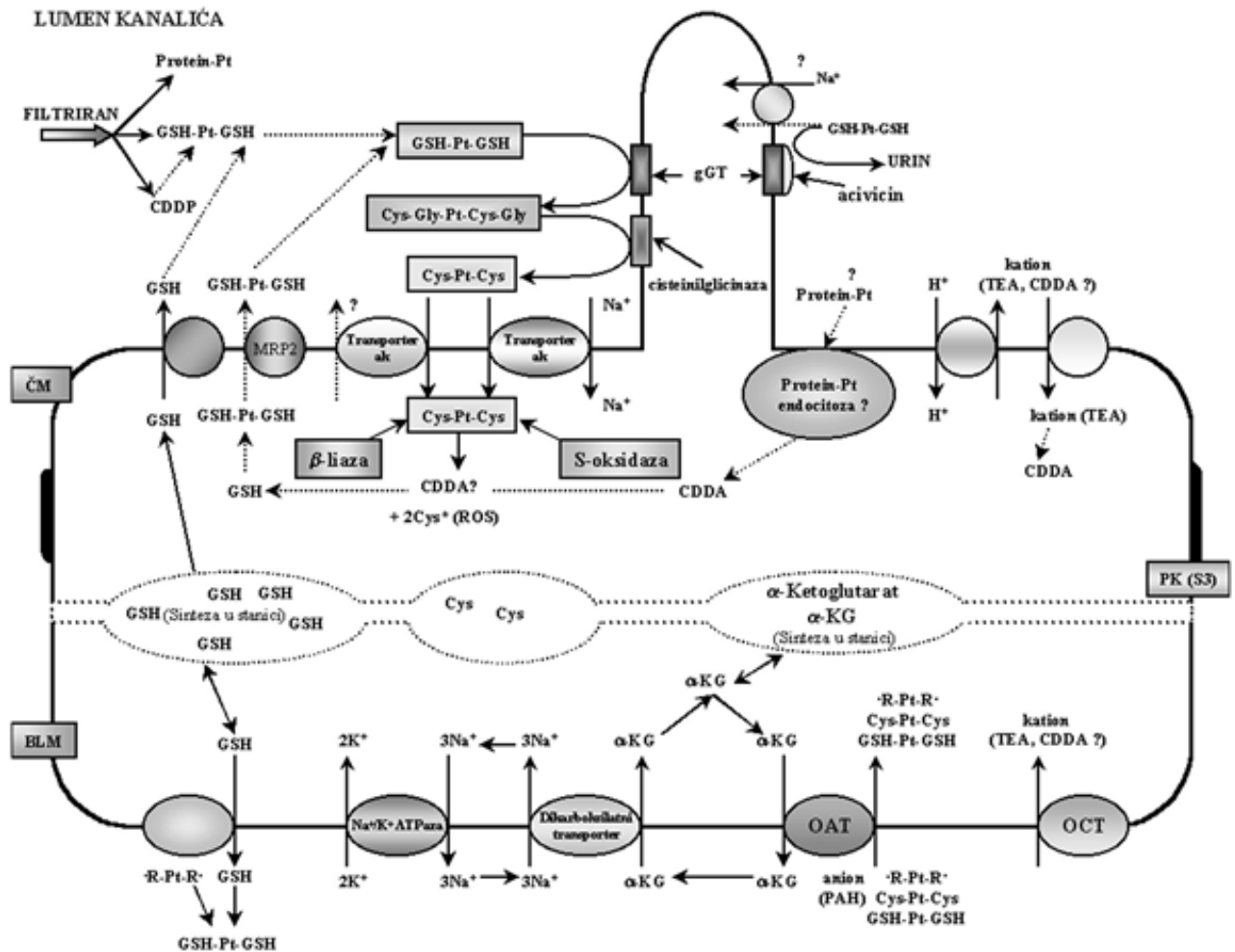
Ulazak cisplatine u stanice nefrona predstavlja kompleksan proces. Različiti dijelovi bubrega različito nakupljaju cisplatinu, od njih najviše proksimalni kanalić, što se smatra glavnim uzrokom nefrotoksičnosti. Također je pokazano da cisplatina ulazi u stanice različitim putevima koji su od različite važnosti (Ljubojević, 2003).

Pokusi *in vitro* pokazali su da postoji razlika između aktivnih prijenosnih mehanizama ulaska cisplatine u epitelnu stanicu bubrega kroz bazolateralnu i apikalnu membranu. Ulazak kroz apikalnu membranu je slabiji, no odgovoran je za induciranje apoptoze u stanici (Okuda i sur., 1999). Cisplatina ulazi u kanaliće nefrona kao dio glomerulskog filtrata, gdje može biti slobodna ili vezana na manje proteine ili molekule i tako dolazi do apikalne membrane epitelnih stanica. Također, sekretornim putem cisplatina može preko fenestriranog epitela kapilara u bubregu ulaziti u intersticij i tako doći do bazolateralne membrane epitelnih stanica (Ljubojević, 2003).

Cisplatina koja je vezana na glutation ima različite puteve ulaska u stanicu kroz apikalnu i bazolateralnu membranu. Kod apikalne membrane na površini stanice glutation se razgrađuje enzimom gama-glutamil transferazom (gGT), koja je prisutna samo na apikalnoj membrani ravnih S3 odsječaka proksimalnih kanalića. Enzim gGT odcjepljuje  $\gamma$ -glutamat od glutationa, nakon čega aminopeptidaza cisteinilglicinaza katalizira razgradnju konjugata cisplatine sa aminokiselinskim ostacima cisteinil-glicina, čime nastaje konjugat cisplatina-cistein. Mehanizam ulaska ovog konjugata u stanicu nije točno poznat, premda ima nekoliko mehanizama koji bi mogli biti uključeni. Jedan pretpostavljeni put ulaska je pomoću natriju ovisnog i/ili neovisnog prijenosnika aminokiselina ili prijenosnika dipeptida. Ako cisplatina ulazi u stanicu kao konjugat s cisteinom, reakcija razgradnje konjugata može ići preko enzima  $\beta$ -liaze ili S-oksidaze, čime nastaju reaktivne -SH skupine (Parks i sur., 2000) (Slika 9). Ove reakcije mogu dovesti do oksidacijskog stresa u stanici.

Alternativni način prijenosa kompleksa cisplatina-cistein, formiranog uzvodno u nefronu i/ili u drugim organima te otpuštenog u krvotok, je prijenos pomoću prijenosnika organskih aniona i kationa. Prijenosnik organskih aniona (*engl.* organic anion transporter, OAT) je terciarno aktivni antiport preko kojega u stanicu na bazolateralnoj membrani ulazi para-aminohipurna kiselina (PAH) u zamjenu za dikarboksilate i trikarboksilate koji izlaze iz stanice (Slika 9). Kompleks cisplatine može ulaziti u stanicu ovim putem umjesto PAH-a.

Prema tome jedan od načina djelomične inhibicije ulaska cisplatine u stanice nefrona je davanje inhibitora prijenosa organskih aniona probenecida (Meyer i Madias, 1994).



**Slika 9.** Shematski prikaz različitih puteva ulaska cisplatine u stanicu proksimalnih kanalića bubrega. Mehanizmi su detaljnije opisani u tekstu. (Preuzeto iz rada Ljubojević, 2003.)

Cisplatina kompetitivno inhibira ulazak tetraetilamonija (TEA) što pokazuje da koristi i prijenosnik organskih kationa (*engl.* organic cation transporter, OCT) za ulazak u stanicu. Mogući prijenosnici cisplatine mogli bi biti protusmjerni prijenosnik vodikovih iona i kationa neovisan o natriju, koji se nalazi na apikalnoj membrani ili njemu sličan prijenosnik koji je smješten na bazolateralnoj membrani (Ljubojević, 2003) (Slika 9).

Cisplatina vezana na proteine sa SH skupinom može u stanicu ulaziti i putem endocitoze u stanicama proksimalnih kanalića. Ovim putem u stanicu ulaze proteini male molekulske mase, kao što su metalotionein i albumin koji na sebe imaju vezanu cisplatinu. Stanice proksimalnih kanalića imaju izraženu endocitozu zbog svoje funkcije reapsorbicije bjelančevina iz glomerulskog filtrata. Unutar stanice apsorbirani proteini razgrađuju se endosomsko-

lizosomskim putem i oslobađa se cisplatina iz kompleksa (Slika 9). Prijenos cisplatine u stanicu je kompleksan i nije potpuno istražen. Navedeni mehanizmi nisu jedini uključenu i njihov točan značaj nije potpuno istražen (Ljubojević, 2003).

#### **1.4.2. Djelovanje cisplatine u stanici nefrona**

Ulazak cisplatine u stanice nefrona najprije izaziva nastanak ROS-ova i drugih molekula koje potiču signal oksidacijskog stresa u stanicama kao što su dušikov (II) oksid (NO) i ugljikov monoksid (CO). Oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom ovise o koncentraciji primijenjene cisplatine (Ghosh, 2012). Ubrzo nakon tretmana, unutar 1-2 dana, zbog smanjenja protoka krvi kroz bubreg dolazi do hipoksije osjetljivih stanica epitelnih stanica S3 odsječka i nastupa akutno zatajenje bubrega (Ljubojević, 2003). Smanjenje razine glutaciona i njegova oksidacije jedan je od najboljih pokazatelja oksidacijskog stresa, makar točna uloga ove pojave u nefrotoksičnosti nije poznata. Uz GSH pokazatelj oksidacijskog stresa je i povišena razina metalotioneina u stanici koji služi za zaštitu bubrega od oksidacijskog stresa (Meyer i Madias, 1994)

Prethodno opisana citotoksična djelovanja cisplatine, kao što su oštećenje mitohondrija, smanjenje transkripcije i genotoksičnost, kod tumorskih stanica utječe i na stanice epitela nefrona (Ghosh, 2012 i Kartalou i Essigmann, 2001). Uz smanjenje transkripcije dolazi i do smanjenja translacije na razini ribosoma zbog interakcije cisplatine sa staničnim proteinima (Ishikawa i Ali-Osman, 1993). Također dolazi do inhibicije prijenosa u stanicu preko neposrednog vezanja cisplatine za proteine ili posredno preko poremećaja signalnih puteva ili energetskih procesa (Ljubojević, 2003).

Citotoksičnost cisplatine izražena je u S3 segmentu proksimalnih kanalića, no i ostatku bubrega uočeni su različiti faktori povezani s zaštitom od stresa kao što su povišeni metalotionein, hemoksigenaza-1, klasterini i prijenosnici za izbacivanje toksičnih spojeva iz stanice. Prema ovome preživljavanje i popravak oštećenja ili stanična smrt ovisi o općem i specifičnom staničnom odgovoru na stres (Ljubojević, 2003).

Posljedica visoke koncentracije cisplatine u stanici je jaki oksidacijski stres koji dovodi do smanjenja glutaciona i -SH proteina, oštećenja mitohondrija i curenja  $Ca^{2+}$  i citokroma c iz mitohondrija, što dovodi do nekroze. Međutim stanice bubrega ne koncentriraju dovoljno visoku koncentraciju cisplatine da bi došlo do nekroze kod tretmana (Ljubojević, 2003). Stanice

nefrona umjesto toga vjerojatno idu u ferroptozu, jer je mehanizam odlaska u staničnu smrt različit nego kod stanica tumora. Ferroptozu je neapoptotska, regulirana stanična smrt koja ovisi o željezu i karakterizirana je smanjenom aktivnosti glutathion peroksidaze 4 (Gpx 4), koja dovodi do povećane peroksidacije lipida i nastanka lipidnih ROS-ova. Ova vrsta stanične smrti različita je od apoptoze i nekroze po tome što stanična smrt ovisi o nedostatku glutathiona odnosno cisteina te o peroksidaciji lipida uzrokovanoj oslobođenim željezom (Yu i sur., 2019). Dok je kod stanica tumora glavni razlog programirane stanične smrti oštećenje DNA, kod stanica bubrega glavni uzroci regulirane stanične smrti su oksidacijski stres, promjene u metabolizmu stanice i strukturne promjene (Ljubojević, 2003).

Pokazano je i da se nakon tretmana cisplatinom povisuje razina TNF- $\alpha$  (*engl.* tumor necrosis factor  $\alpha$ ) u bubregu, koji se može lučiti autokrinno. To ukazuje i na moguću kontroliranu, apoptozu posredovanu receptorom u stanicama nefrona, što je pokazano povišenjem podjedinice receptora Fas, Fas liganda, TNF- $\alpha$  i kaspaze-8 koja sudjeluje u ovome putu apoptoze (Tsuruya i sur., 2003).

### **1.4.3. Cisplatina i akutno zatajenje bubrega**

Akutno zatajenje bubrega (*engl.* acute renal failure, ARF) nastupa 2-3 dana nakon početka tretmana cisplatinom i glavno je obilježje nefrotoksičnosti. Tijekom prvih 2-4 sata nakon ubrizgavanja lijeka oko 50% se izlučuje urinom. Nakon 48 sati oko 76% cisplatine je izlučeno iz plazme. Dalje se cisplatina polagano izlučuje iz organa koji ju isprva nakupljaju (Meyer i Madias, 1994). Stanice proksimalnih kanalića bubrega brzo nakupljaju cisplatinu. Specifično stanice S3 segmenta koncentriraju cisplatinu u sebi i osjetljive su na stres i oštećenja uzrokovana cisplatinom (Schnellmann, 2013).

Prvi simptom koji nastaje ubrzo nakon tretmana cisplatinom i jedini koji prethodi ARF-u je rana hipoosmotska poliurija. Početna poliurija nastaje zbog prolaznog pada razine vazopresina (Meyer i Madias, 1994). Akutno zatajenje bubrega nastaje zbog smanjenja protoka plazme (*engl.* renal plasma flow, RPF), RBF-a i GFR-a. (Ljubojević, 2003).

Akutno zatajenje bubrega uzrokuje različite povratne i nepovratne patofiziološke promjene koje se očituju u dužem vremenskom periodu s nizom pokazatelja o nastalom stanju. Neki pokazatelji narušene reapsorpcijske funkcije su gubitak magnezija, kalcija, kalija i fosfata i također natriurija, glukozurija, proteinurija i enzimurija. Ovi pokazatelji praćeni su u različitim

uvjetima, s različitim koncentracijama tretmana cisplatinom i daju dosta različite rezultate (Ljubojević, 2003).

#### 1.4.4. Cisplatina i kronična bolest bubrega

Kod animalnih modela pokazalo se da dugotrajno djelovanje cisplatinom uzrokuje kroničnu bolest bubrega (*engl.* chronic kidney disease, CKD) i fibrozu. Isto je dokazano i kod ljudi. Osobe koje razviju ARF nakon tretmana cisplatinom imaju veću vjerojatnost da kasnije razviju i CKD, dok rizik razvijanja CKD bez prethodnog akutnog zatajenja bubrega nepoznat. Kronična bolest bubrega je progresivno stanje u kojemu bubreg tijekom vremena gubi svoje funkcije, bez tretmana može dovesti do potpunog zatajenja bubrega, stanja koje traži ili redovitu dijalizu ili hitnu transplantaciju bubrega (Sharp i sur., 2018).

Fibroza bubrega, koja je uvijek prisutna kod CKD, karakterizirana je intersticijalno-tubularnom fibrozom, atrofijom kanalića i glomerulosklerozom. Stanične promjene do kojih dolazi kod fibroze su: infiltracija stanica povezanih s upalom, aktivacija i nakupljanje fibroblasta, nastajanje i izlučivanje velike količine komponenata ekstracelularnog matriksa (*engl.* extracellular matrix, ECM), atrofija tubula i smanjenje gustoće kapilara. Fibroblasti su stanice mezenhimalnog porijekla prisutne u ECM-u vezivnog tkiva i organa koje stvaraju elastin, kolagen i druge komponente fibrilarne mreže ekstracelularnog matriksa u tom tkivu. Miofibroblasti u bubregu stvaraju se prilikom fibroze i najvjerojatnije predstavljaju dediferencirani oblik fibroblasta pod stresom. Postoji velika heterogenost između aktiviranih fibroblasta i miofibroblasta u fibrozi. Neki od njih potječu iz senescentnih fibroblasta bubrežnog tkiva, neki iz fibrocita iz krvotoka, a neke nastaju procesima endotelno-mezenhimske tranzicije (*engl.* endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT) i epitelno-mezenhimske tranzicije (*engl.* epithelial-mesenchymal transition, EMT). Uloge EndMT-a i EMT-a su diferencijacija i aktivacija fibroblasta i miofibroblasta iz endotelnih i epitelnih stanica kako bi mogle stvarati više ekstracelularnog matriksa (He i sur., 2013).

Epitelno-mezenhimska tranzicija je proces pri kojemu polarne epitelne stanice, koje su obično vezane na bazalnu membranu, prolaze kroz biokemijske promjene koje im omogućuju da poprime fenotip mezenhimskih stanica. Mezenhimski fenotip uključuje veću mogućnost migracije i invazivnosti, otpornost na apoptozu i veću produkciju komponenata ekstracelularnog matriksa. Po završetku EMT-a dolazi do degradacije bazalne membrane i

formacije mezenhimske stanice koja ima mogućnost migrirati dalje od svojeg prijašnjeg epitelnog sloja. Tip EMT-a povezan s fibrozom naziva se tip II. EMT ovog tipa odgovoran je za zacjeljivanje rana i regeneraciju tkiva i započinje kao odgovor na ozljedu ili upalu kako bi rekonstruirali oštećeno tkivo stvaranjem fibroblasta i drugih sličnih stanica (Kalluri i Neilson, 2003, Kalluri i Weinberg, 2009).

U prijašnjoj studiji pronađeno je da je NaK ATPaza jedna od molekularnih ciljeva signalizacije TGF- $\beta_1$  kod EMT-a. Kod induciranja EMT-a pomoću TGF- $\beta_1$  smanjena je ekspresija podjedinice  $\beta_1$  NaK ATPaze na površini stanice, čak prije promjene karakterističnih markera EMT kao što su E-kadherin, fibronektin i  $\alpha$ -SMA (*engl.* alpha smooth muscle actin). Pokazano je da je smanjenje NaK- $\beta_1$  važno za indukciju EMT-a. Kod stanica bez ekspresije NaK- $\beta_1$  dobivenih korištenjem interferirajućih RNA došlo je do gubitka epitelnog fenotipa, dok je ektopična ekspresija NaK- $\beta_1$  usporila razvoj fenotipa fibroblasta i smanjila razine fibronektina i  $\alpha$ -SMA-da. Također u istraživanjima fibroze bubrega kod dijabetesa pokazano je da su količine podjedinica  $\alpha_1$  i  $\beta_1$  NaK ATPaze smanjene kod fibroznog tkiva u usporedbi sa zdravim kontrolnim tkivom. Ovo je pokazano i kod modela dijabetesa uzrokovanog streptozotocinom kod štakora. Iz ovih rezultata vidljivo je da je NaK ATPaza povezana s EMT-om kod fibroze i kod razvoja tumora (Rajasekaran i sur., 2010).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cisplatina je važan citostatik korišten diljem svijeta za liječenje različitih malignih oboljenja. Unatoč svojoj učinkovitosti cisplatina ima brojne nuspojave, jedna od kojih je visoka nefrotoksičnost. Stanice S3 segmenta proksimalnog kanalima nefrona iznimno su osjetljive na ksenobiotike, među koje spada cisplatina. Nefrotoksičnost cisplatine između ostaloga uključuje i pojavu upale i proces epitelno-mezenhimske tranzicije. U prijašnjim istraživanju pokazano je da se podjedinice NaK ATPaze mogu koristiti kao markeri za EMT. Cilj ovog rada je preliminarno istražiti vremenski tijek promjene ekspresije  $\alpha$  podjedinice NaK ATPaze u S3 segmentu i ostalim segmentima nefrona kod štakora tretiranih cisplatinom. Za ove eksperimente koristila sam metodu indirektno imunohistokemije na narescima fiksiranog tkiva bubrega kroz dane nakon tretmana cisplatinom do 5 dana kod arhivskih uzoraka. Također pomoću metode krajnjeg broja ciklusa RT-PCR i metode western blota usporedila sam relativnu ekspresiju mRNA za  $\alpha_1$ -NaK i konačnu količinu proteina  $\alpha_1$ -NaK u kontrolnim uzorcima i uzorcima bubrega 5 dana nakon tretmana, koji su također uzeti iz prethodnih istraživanja. Hipoteza ovog rada je da dolazi do smanjenja ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze nakon tretmana cisplatinom i da do najvećeg smanjenja dolazi kod S3 segmenta proksimalnog kanalića nefrona.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije i pribor

*Kemikalije i pribor u radu s pokusnim životinjama:*

Narketan, Xylapan; Chassot (Bern, Švicarska). Cisplatina; Hexal AG (Holzkirchen, Njemačka).

*Inhibitori proteaza pri izolaciji membrana:*

PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluorid), Sigma Fast (St. Luis, MO, SAD).

*Kemikalije i pribor za izolaciju membrana i pripremu uzoraka za western analizu:*

Manitol, Triton-X-100, EDTA (etilendiamin N,N,N',N'-tetraoctena kiselina), EGTA (etilen-glikol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina), BPB (brom-fenol-plavo), BSA (albumin iz seruma goveda); Sigma (St. Luis, MO, SAD). Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie plavilo); Serva (Heidelberg, Njemačka). Glicerol; Merck (Darmstadt, Njemačka). Limunska kiselina, octena kiselina; Kemika (Zagreb, Hrvatska). Centrifuga s hlađenjem (Sorvall RC2B, rotor SS-34), ultracentrifuga (OTD-Combi, rotor T-875); Sorvall Instruments (Newtown, CT, SAD). Električni homogenizator (Powergen 125); Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD). Spektrofotometar (CECIL 9000); Cambridge (Engleska, UK).

*Kemikalije i pribor za western analizu:*

Komplet BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat) i NBT (nitromodri tetrazolium klorid), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin); Sigma (St. Luis, MO, SAD). SDS (natrijev-dodecil-sulfat); Serva (Heidelberg, Njemačka). Tris, akrilamid, bis-akrilamid; Boehringer (Mannheim, Njemačka). Amonijev persulfat (APS); PageRuler<sup>TM</sup> nebojeni standard molekulskih masa proteina; Termo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD).  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ ME), aparatura Mini Protean III Cell, MiniTrans-Blot Cell za SDS-PAGE; BioRad (Hercules, CA, SAD). Hidrofobna najlonska membrana Immobilon (Polyvinylidene fluoride, PVDF); Millipore (Bedford, MA, SAD).

*Kemikalije i pribor za pripremu tkivnih narezaka i imunohistokemiju:*

Paraformaldehid; EMS (Los Almitos, CA, SAD). Pumpa za perfuziju (Masterflex pumpa); Cole-Parmer (Chicago, IL, SAD). NaN<sub>3</sub> (natrijev azid), predmetna stakalca

(Superfrost/Plus Microscope slides); Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD). Uklopni medij (O.C.T. Compound 4583) Tissue-Tek; Sakura Finetek (Torrance, CA, SAD). Kriomikrotom (Leica CM 1580); Leica Instruments (Nussloch, Njemačka). Ksilol, izopropanol, etanol, metanol, octena kiselina, natrijev citrat; Kemika (Zagreb, Hrvatska). BSA (albumin iz seruma goveda); Sigma (St. Luis, MO, SAD). Sekundarno protutijelo GAMAP; Kirkegaard & Perry (Gaithersburg, MD, SAD). Sekundarno protutijelo GAMCY3, Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, SAD). Boja Hoechst 33342, Sigma (St. Luis, MO, SAD). Otopina za očuvanje fluorescencije (Vectashield); Vector Labs (Burlingame, CA, SAD). Fluorescencijski mikroskop (OPTON III RS); Opton Feintech (Oberkochen, Njemačka). Digitalna kamera (SPOT RT); Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, SAD).

#### *Kemikalije i pribor za izolaciju ukupne RNA i „end-point“ RT-PCR:*

RNAlater, etidijev bromid, Sigma (St. Luis, MO, SAD). Električni homogenizator (Powergen 125); Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD). Autoklav; Bari (Zagreb, Hrvatska). Spektrofotometar (CECIL 9000); Cambridge (Engleska, UK). UltraPURE voda (RNaza/DNaza čista voda), TRIzol; Gibco-BRL (Grand Island, NY, SAD). Komplet za sintezu cDNA (First Strand cDNA Synthesis), PCR komplet (PCR Master Mix); PCR uređaj 2720; Applied Biosystems- Termo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD). Komplet za pročišćavanje RNA (RNeasy Mini Kit); Qiagen (Hilden, Njemačka). Centrifuga s hlađenjem 5417R; Eppendorf AG (Hamburg, Njemačka). Početnice svih gena; (*on line*, MetaBion Int. Germany, dobavljač: [http://www.gorea-plus.hr/custom\\_primer/](http://www.gorea-plus.hr/custom_primer/)).

### **3.1.2. Pufferi i otopine**

Fosfatni puffer (**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.

Puffer za izolaciju ukupnih staničnih membrana iz tkiva (**homo-puffer**): 300 mM manitol, 5 mM EGTA, 12 mM Tris/HCl, pH 7.4.

Puffer za denaturaciju proteina (**Laemmli-puffer**): 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). Pufferu se neposredno prije uporabe dodaje βME u omjeru 17:3.

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

a) akrilamid/ bis-akrilamid : 30 g poliakrilamida/0.8 g bis-akrilamida u 100 mL H<sub>2</sub>O.

Skladišti se na 4 °C do upotrebe.

- b) pufer A : 1.5 M Tris-HCl, pH 8.9 (18.17 g/100 mL) – pufer za pripravljanje gela za odjeljivanje proteina.
- c) pufer B : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (6.06 g/100 mL) – pufer za pripravljanje gela za sabijanje proteina.
- d) amonijev persulfat (APS): 100 mg/7.1 mL H<sub>2</sub>O – napravljen svježi.
- e) 10 % (v/v) SDS u H<sub>2</sub>O.

Pufer za elektroforezu u denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (**PAGE-pufer**):

25 mM Tris, 0.2 M glicin, 1 % (v/v) SDS.

Pufer za prijenos proteina na membranu (**transfer-pufer**):

15.6 mM Tris, 120 mM glicin, 20 % (v/v) metanol.

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

Pufer za blokiranje (**blotto-pufer**): 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.

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).

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).

Otopina etidijeva bromida: 1 mg/mL H<sub>2</sub>O.

## 3.2. Metode

Svi postupci koji su izrađeni u prijašnjem istraživanju iz kojega su uzimati uzorci koje sam koristila opisani su u pasivu, ostali postupci koje sam radila na arhivskim uzorcima opisani su u 1. licu aktiva.

### 3.2.1. Pokusne životinje i tretman cisplatinom

U svim pokusima korišteni su mužjaci štakora soja Wistar, stari tri mjeseca (odrasli) iz uzgoja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi tijekom pokusa. Pokusi su bili odobreni od strane Etičkog povjerenstva Instituta.

Otopina cisplatine ubrizgavana je u dozama, koncentraciji i na način prethodno opisan u literaturi, jednokratno, u dozi od 5 mg cisplatine/kg t.m., i.p. (Safirstein i sur., 1987). Kontrolnoj skupini štakora ubrizgavan je određeni volumen puferirane fiziološke otopine (PBS; 5 mL/kg t.m.). Korištene su 3 tretirane i kontrolne skupine. U svakoj skupini bile su po četiri životinje, ukupno je bilo 12 tretiranih i 12 pokusnih životinja.

### 3.2.2. Protutijela

Za imunokemijske metode western analize i imunohistokemiju rabila sam sljedeće primarno monoklonsko protutijelo: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ (H-3): sc-48345 od tvrtke Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. Ovo je mišje monoklonsko antitijelo koje prepoznaje aminokiselinski slijed između 551-850 aminokiseline podjedinice  $\alpha_1$ -NaK ATPaze ljudskog porijekla. Prema preporuci proizvođača ovo antitijelo može se koristiti za detekciju ljudske, mišje i štakorske podjedinice  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod metoda western blot i imunohistokemije.

Sekundarna protutijela nabavljena su komercijalno i korištena prema uputama proizvođača. Za metodu western blot korišteno je kozje protutijelo za mišji IgG s vezanim enzimom alkalnom fosfatazom u razrijeđenju 1:1000 (*engl.* goat anti-mouse alkaline phosphatase, GAMAP). Koristila sam ga u koncentraciji od 0.25  $\mu$ g/mL.

Sekundarno protutijelo za imunohistokemiju bilo je magareće anti-mišje IgG protutijelo (*engl.* donkey anti-mouse fluorescein, DAM CY3), koje je bilo obilježeno fluorescirajućom molekulom CY3 u razrijeđenju 1:400 (daje crvenu fluorescenciju), korišteno u koncentraciji od 1.6  $\mu$ g/mL.

### 3.2.3. Fiksiranje tkiva *in vivo*

Štakori su uspavani dvokomponentnim anestetikom u sljedećem omjeru: Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p. Krvožilni sustav je perfundiran kroz srce prvo PBS-om (zagrijan na 37 °C i aeriran mješavinom plinova 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>) tijekom 2-3 min radi odstranjivanja krvi iz cirkulacije, a zatim svježe pripremljenim fiksirajućim sredstvom PLP (4% paraformaldehid, 10 mM natrijev perjodat, 70 mM lizin) tijekom narednih 4-5 min (McLean i Nakane, 1974). Izvađeni bubrezi narezani su u više narezaka i dodatno su fiksirani tijekom noći u istom fiksativu pri 4 °C. Tkivo je nakon toga ispirano u PBS 4x10 min i pohranjeno do daljnje uporabe pri 4 °C u PBS koji je sadržavao 0.02% NaN<sub>3</sub>.

### 3.2.4. Tkivni naresci i posredna imunofluorescencija

Prije zamrzavanja tkivnih narezaka fiksirani uzorak namakala sam tijekom nekoliko sati preko noći (*engl.* over night, ON) u 30% saharozi (u PBS) radi zaštite staničnih struktura od razaranja pri niskim temperaturama. Nakon toga tkivo sam uklopila u polimerni uklopni medij O.C.T. te ga smrznula u kriostatu pri temperaturi od  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kada je tkivo bilo potpuno smrznuto narezala sam nareske debljine  $4\text{ }\mu\text{m}$  kriomikrotomom Leica CM 1580 i nalijepila ih na predmetna stakalca Superfrost/Plus Microscope slides.

Prvi korak pripreme narezaka je rehidracija u 1x PBS-u tijekom 10 min. Nakon rehidracije nareske sam kuhala četiri puta po 5 min u otopini 10 mM otopini citratnog pufera pH 6 kako bi se oslobodili epitopi za vezanje s antitijelima. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi nareske sam isprala tri puta po 5 min s otopinom 1x PBS-a. Zatim sam stakalca s narescima stavila u otopinu 0,5%-tnog Tritona-X-100 u PBS-u na 10 min i potom u otopinu 2%-tnog Tritona-X-100 u PBS-u na 20 min. Nakon toga nareske sam isprala dva puta u 1x PBS-u po 5 min nakon čega je slijedila inkubacija u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi s otopinom 1%-tnog BSA tijekom 30 min kako bi se blokiralo nespecifično vezanje antitijela na preparat. Nakon inkubacije s preparata sam obrisala većinu otopine BSA i na preparate dodala otopinu primarnog protutijela i stavila na inkubaciju preko noći (12 sati) na  $+4^{\circ}\text{ C}$ . Kako bih isprala nevezana antitijela nakon inkubacije preparate sam stavila u otopinu 0,1%-tnog Tritona-X-100 u PBS-u na 10 min i potom još dva puta sprala s 1x PBS-om po 5 min. Nakon toga slijedila je inkubacija sa sekundarnim antitijelom DAM-CY3 razrjeđenja 1:400 1 sat u vlažnoj komorici na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije ponovila sam postupak ispiranja kao i nakon inkubacije s primarnim antitijelom. Za bojanje jezgara na preparatu dodala sam boju Hoechst 33342 u koncentraciji od 0,01% na 2 min nakon čega sam boju isprala dvaput u 1x PBS-u po 5 min. Nakon toga na preparate sam dodala otopinu Vectashield razrijeđenu 1:2 u alkalnom puferu (Tris pufer A za SDS-PAGE, pH 8.5) kako bi se očuvala fluorescencija i preparate prekrila pokrovnim stakalcem.

Za pretraživanje obojenih tkivnih narezaka koristila sam fluorescencijski mikroskop OPTON III RS, pozitivne nalaze snimila sam digitalnom kamerom SPOT RT i obradila ih računalom Compaq E.V.O. (Pentium 4PC), rabeći računalni program Adobe Photoshop 6.0.



### **3.2.5. Izolacija ukupnih staničnih membrana iz pojedinih dijelova bubrega**

Za izolaciju ukupnih staničnih membrana (USM) primijenjena je metoda diferencijalnog centrifugiranja. Štakori su bili usmrćeni prekidanjem vratne kralježnice. Izvađeni bubrezi oslobođeni kapsule odmah su stavljeni u hladni PBS. Središnji poprečni narezak jednog bubrega debljine ~1 mm odvojen je za izolaciju ukupne stanične RNA i stavljen u odgovarajuću količinu otopine RNAlater tijekom noći pri 4 °C. Iz ostalih poprečnih narezaka bubrega ručno su bile razdvojene kora, vanjski tračak vanjske srži i unutarnji tračak vanjske srži zajedno s unutarnjom srži. Uzorci su stavljeni u hladni homo-pufer, kojem su bili dodani inhibitori proteaza (konačne koncentracije: 1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidin, 0.1 µg/mL antipain) i potom homogenizirani električnim homogenizatorom Powergen 125 (1 min homogenizacija na najjačoj brzini – 2 min pauza – 1 min homogenizacija). Sve postupci izvedeni su na niskoj temperaturi (ledena površina pri rezanju tkiva i ledeni puferi). Homogenati su centrifugirani u centrifugi Sorvall RC2B s hlađenjem na 6,500 rpm (5,000 x g) tijekom 15 min; ovime su istaložene cijele stanice, jezgre i nerazgrađeni tkivni matriks. Dobiveni nadtalog centrifugiran je 1 h u Sorvall ultracentrifugi OTD-Combi na 45,000 rpm (150,000 x g), pri čemu su dobivene USM u talogu. Izolirane membrane su raspršene u homo-puferu, određena im je koncentracija proteina i zamrznute se pri -70 °C do upotrebe. Ovo je detaljan opis postupaka kojima su dobiveni arhivski uzorci proteina koje sam koristila za analizu western blot  $\alpha 1$  podjedinice proteina NaK ATPaze.

### **3.2.6. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentraciju proteina u uzorcima izoliranih membrana mjerila sam spektrofotometrijski, metodom po Bradfordu (1976). Osnovni princip ove metode temelji se na promjeni ionskog stanja boje Coomassie plavila pri vezanju na proteine, čime boja počinje apsorbirati svjetlost valne duljine od 595 nm. Standardnu krivulju koncentracije proteina izmjerila sam rabeći otopinu goveđeg albumina u koncentracijskom rasponu od 0.2 – 1.2 mg/mL. Osjetljivost metode je 0.1 mg/mL. Uzorke sam razrjeđivala tako da im je optička gustoća bila u linearnom području standardne krivulje. Uzorci su stajali u otopini boje 10 minuta, nakon toga sam im očitavala gustoću naspram slijepe probe (uzorak bez proteina). Za mjerenja koristila sam spektrofotometar CECIL 9000. Pripadajuće koncentracije proteina očitala sam iz standardne krivulje.

### 3.2.7. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) i analiza western blot

Koncentraciju proteina u pripravcima USM podesila sam na 6 mg/mL ili manje. Uzorke sam priredila za SDS-PAGE miješanjem s Laemmli-puferom za denaturaciju proteina. Konačna koncentracija proteina bila je za trećinu manja odnosno 4 mg/mL za izolate iz kore bubrega i 2,67 mg/mL za izolate iz vanjske srži u smjesi koja je, osim proteina, sadržavala i 1% (v/v) SDS, 12% (v/v) glicerol, 30 mM Tris/HCl, pH 6.8, BPB u tragovima i 5% (v/v)  $\beta$ ME. Uzorke sam dodatno denaturirala zagrijavanjem pri 37 °C tijekom 30 min. Prethodno su na uzorku iz kore provjereni uvjeti za elektroforezu pri zagrijavanju na 37 °C tijekom 30 min, 65 °C tijekom 15 min i 95 °C tijekom 5 min, sa i bez dodatka  $\beta$ ME i utvrđeno je da su optimalni uvjeti zagrijavanje na 37 °C tijekom 30 minuta uz  $\beta$ ME.

Paralelno s proteinima iz uzoraka membrana (40  $\mu$ g ili manje) razdvajala sam i uzorak standarda molekulskih masa u rasponu 10–200 kDa, prethodno priređen na isti način kao i uzorci proteina.

Za izvedbu SDS-PAGE koristila sam aparaturu Mini Protean II Cell uz konstantan napon od 100 V tijekom 2 sata. Proteinske molekule s gela prenijela sam na hidrofobnu najlonsku membranu Immobilon elektroforetskim prijenosom uz konstantni napon 100 V tijekom 2 sata u aparaturi MiniTrans-Blot Cell. Uspješnost prijenosa proteina iz gela na membranu provjerila sam kratkotrajnim bojanjem membrane otopinom Coomassie plavila, membranu s obojanim ukupnim proteinima sam skenirala, nakon čega sam isprala boju u otopini za odbojavanje. Izrezala sam dio membrane sa standardima molekulskih masa, a ostatak membrane namakala sam 1 sat u blotto-puferu u svrhu odbojavanja i blokiranja nespecifičnog vezanja protutijela. Nakon blokiranja membranu sam namakala u otopini s primarnim protutijelom (razrijeđenim u blotto-puferu) tijekom noći uz zibanje pri 4 °C. Razrjeđenje protutijela za alfa1 podjedinicu NaK ATPaze bilo je 1:1000.

Nakon višekratnog ispiranja membrane s uzorcima blotto-puferom bez protutijela, inkubirala sam membranu tijekom 1 sata u sekundarnom protutijelu na sobnoj temperaturi. Korišteno sekundarno protutijelo bilo je GAMAP koncentracije 0.25  $\mu$ g/mL. Nakon inkubacije u sekundarnom protutijelu ponovno sam ispirala membranu blotto-puferom 2x15 min i PBS-om 2x10 min. Zatim sam membranu podvrgla reakciji konjugiranog enzima alkalne fosfataze sa supstratom BCIP/NBT u alkalnom puferu (20 mM Tris, pH 9). Smeđe-ljubičasto obojenje nastaje zbog oksidacijske reakcije fosfataze vezane na sekundarno antitijelo i supstrata BCIP/NBT. Boja se razvija na mjestu gdje je sekundarno antitijelo vezano na primarno, koje je

vezano na sam antigen na membrani. Jačina obojenja taloga razmjerna je količini prisutnog antigena, što omogućuje denzitometrijsku procjenu količine antigena u uzorcima.

### **3.2.8. Denzitometrija**

Za denzitometrijska mjerenja relativne količine antigena u dobivenim prugama nakon western analize koristila sam denzitometrijski program tvrtke BioRad. Svaki uzorak na membrani uokvirila sam na jednakoj površini sa proteinskom prugom, te sam izvršila mjerenje gustoće obojenja. Također sam denzitometrijski mjerila ukupne proteine prebačene na membranu i obojene Coomassie plavilom kako bi rezultate mogla normirati na ukupnu količinu proteina s obzirom na to da nisam usporedno detektirala protein sa stalnom ekspresijom. Rezultate sam prikazala kao relativne vrijednosti naspram gustoće srednje vrijednosti pruga (=100) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka i podijeljene s ukupnom količinom proteina.

### **3.2.9. Izolacija ukupne RNA**

Svi postupci koji uključuju rad s RNA provođeni su s dodatnim oprezom radi svođenja aktivnosti ribonukleaza (RNaza) na najmanju moguću mjeru, koristeći pri tome autoklavirano suđe i vodu prethodno tretiranu DEPC-om (120 °C, 20 min, 1.4 atm).

Ukupnu RNA izolirana je iz kore bubrega, koja je ručno odvojena iz poprečnog nareška, uz upotrebu otopine TRIzol prema uputama proizvođača. Naresci bubrega bili su prethodno pohranjeni u otopini RNAlater koja sadrži inhibitore RNaza kako bi se očuvala cjelovitost RNA pri -20 °C tijekom duljeg vremenskog perioda. Dodatno, kako bi se uklonile nečistoće (soli, genomske DNA, proteini), koristio se komplet za pročišćavanje RNA (RNeasy Mini Kit) prema uputama proizvođača. Tkivo je homogenizirano i u lizat dodano je 350 µl pufera RLT. Lizat je centrifugiran 3 min. na najvećoj brzini. Supernatant je pažljivo odvojen pipetiranjem, u njega je dodan jedan volumen 70% etanola i dobro promiješan pipetom. U kolonu RNeasy mini prebačeno je 700 µl lizata i kolona je stavljena u tubicu za sakupljanje od 2 ml i centrifugirana 15 sekundi na 8000 x g. Nakon centrifugiranja tekućina u tubici za sakupljanje je bačena. Na kolonu je dodano 700 µl pufera RW1 i centrifugirano 15 sek. na 8000 x g. Tekućina u tubici za sakupljanje je ponovno bačena. Na kolonu dodano je 500 µl pufera RPE i ponovno je centrifugirano 15 sek. na 8000 x g i bačena tekućina iz tubice za sakupljanje. Dodano je ponovno 500 µl pufera RPE na kolonu i centrifugirano 2 min. na 8000 x g. Kolona je stavljena

u novu tubicu za sakupljanje od 1,5 ml. Na kolonu dodano je 50  $\mu$ l vode bez RNaza i centrifugirano 1 min. na 8000 x g kako bi se eluirala RNA iz kolone.

Kvaliteta izolirane RNA i moguće onečišćenje genomskom DNA provjerena je elektroforezom manje količine izolirane RNA na 1% agaroznom gelu (agaroza otopljena u TAE puferu). Gel je sadržavao 0.1% etidij bromida, interkalirajuće boje koja omogućava prikaz pri osvjetljavanju gela UV lampom (dvije oštre vrpce ribosomalne RNA 18S (2 kb) i 28S (5 kb) imaju omjer 2:1).

Spektrofotometrijski je određena čistoća RNA, mjerenjem apsorbancije na 260 nm (nukleinske kiseline), na 280 nm (proteini) i 230 nm (soli) i izračunavanjem omjera 260/280 (1.6-1.8 u vodi) i 260/230 (>2 u vodi). Otopine uzoraka za mjerenje pripremljene su u autoklaviranoj vodi obrađenoj DEPC-om. Koncentracija RNA određena je prema Lambert-Beerovog zakona, tako da je apsorbancija izmjerena na 260 nm pomnožena s ekstinkcijskim koeficijentom (za RNA iznosi 44.19) i faktorom razrjeđenja.

### **3.2.10. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR)**

Sinteza prvog lanaca cDNA provedena je koristeći komplet (First Strand cDNA Synthesis Kit) prema preporuci proizvođača. Ukupna stanična RNA (3  $\mu$ g) denaturirana je pri 70 °C tijekom 5 min u reakcijskoj smjesi s 0.5  $\mu$ g početnica oligo (dT)<sub>18</sub>, zatim je pokrenuta reverzna transkripcija. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20  $\mu$ L s konačnim odnosima: 1x pufer za reverznu transkripciju (RT), 20 jedinica inhibitora ribonukleaza, 1 mM mješavine dNTP i 40 jedinica reverzne transkriptaze M-MuLV (*engl.* Moloney murine leukemia virus). Reakcijska smjesa inkubirana je pri 37 °C tijekom 60 min, nakon čega je pri 72 °C tijekom 10 min inaktiviran enzima, prema preporukama proizvođača. Dobivena cDNA razrijeđena je 5x u vodi UltraPURE (bez DNaza/RNaza) i pohranjena pri -20 °C do uporabe. Uz svaku reakciju RT provođena je i negativno kontrola bez RNA uz isti volumen vode UltraPURE, kako bi se moglo provjeriti moguće onečišćenje genomskom DNA.

Daljnji postupci rađeni su na uzorcima cDNA dobivenim kako je prethodno opisano. Za reakciju PCR koristila sam komplet PCR Master Mix te sam smjesu složila prema uputama proizvođača. Ukupni volumen smjese od 20  $\mu$ L sadržavao je: 1x pufer za PCR, 0,025 U/ $\mu$ l DNA polimeraze AmpliTaq, 0,2  $\mu$ M mješavine dNTP-ova, 0,4  $\mu$ M specifičnih početnica, 14,9  $\mu$ l vode i 1  $\mu$ L 5x razrijeđene otopine prvog kalupa cDNA. Sljedove specifičnih početnica dobila sam koristeći računalne programe *on line* (Primer3:<http://frodo.wi.mit.edu/cgi->

bin/primer3/primer3\_www.cgi), nakon pronalaženja određenih štakorskih nukleotidnih sljedova u računalnoj bazi NCBI Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>). U računalnoj bazi ELXR v2\_0 (Exon Locator & eXtractor for Resequencing, <http://variation.swmed.edu/ex-lax/index.html>) provjerila sam jesu li početnice na različitim egzonomima, a obilježja samih početnica dodatno sam utvrdila računalnim programom Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Iz liofilizata sam priredila otopine početnica koncentracije 100 mM, a iz njih radne otopine koncentracije 10 mM. Početnice koje sam koristila u reakcijama PCR i veličine PCR-produkata navela sam u Tablici 3. U reakciji end point PCR koristila sam sljedeće uvjete: početna denaturacija 3 min pri 94 °C, a zatim kroz cikluse: razdvajanje (*engl.* denaturation) lanaca 30 sec pri 95 °C, zatim lijepljenje (*engl.* annealing) početnica 30 sec pri 57 °C i reakcija produživanja (*engl.* elongation) 45 sec pri 72 °C.

Uz svaku reakciju PCR provodila sam i negativnu kontrolnu reakciju bez kalupa cDNA uz isti volumen UltraPURE vode (bez DNaza/RNaza) da bih provjerila moguće kontaminacije u PCR reakcijama.

**Tablica 3.** Sljedovi oligonukleotidnih početnica korištenih u reakcijama PCR

Geni i registracijski broj u bazi podataka		nukleotidni slijed (5'-3')	položaj	veličina PCR-produkta (pb)
<i>Atp1a1</i> NaKATPase $\alpha$ 1-subunit NM_012504.1	<b>u</b>	TGACTCAGAACCGGATGACA	1379-1399	352
	<b>n</b>	GCGTTTGGGTTCTTGTGAAT	1730-1720	
<i>GAPDH</i> NM_017008.2	<b>u</b>	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	1105-1125	369
	<b>n</b>	GGATGCAGGGATGATGTTCT	1453-1473	
<i>ciklofilin B</i> NM_022536.1	<b>u</b>	CAAGACCTCCTGGCTAGACG	469-489	344
	<b>n</b>	AAAATCAGGCCTGTGGAATG	792-812	

uzvodna početnica, **u** (*engl.* forward); nizvodna početnica, **n** (*engl.* reverse); pb parovi baza

Produkte RT-PCR razdvojila sam elektroforezom na agaroznom gelu (1.5% u TAE puferu) koji je sadržavao 0.1% etidij bromid i fotografirala ih izložene UV svjetlu. Za svaki od gena s kojim sam započinjala PCR umnažanje, odredila sam optimalan broj ciklusa pri kojim je nastajanje produkta bilo u eksponencijalnoj fazi PCR. Umnožila sam dva potencijalna referentna gena (*engl.* housekeeping genes) za koje se pretpostavlja stabilna ekspresija u stanici:

*ciklofilin B* i *GAPDH*. *Ciklofilin B* se pokazao kao bolji referentni gen, zbog veće homogenosti ekspresije, i njega sam koristila kao kontrolu odstupanja u količini RNA/cDNA između uzoraka.

Za mjerenje relativne ekspresije gena dobivene iz gustoće pruga produkta RT-PCR koristila sam isti program i postupak kao i kod analize western blot. Mjerila sam gustoću RT-PCR produkta za alfa1 podjedinicu NaK ATPaze i ciklofilin B. Rezultate sam prikazala kao relativne vrijednosti naspram gustoće srednje vrijednosti pruga (=100) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka i podijeljene s vrijednostima referentnog gena.

### **3.2.11. Prikaz i statistička obrada podataka**

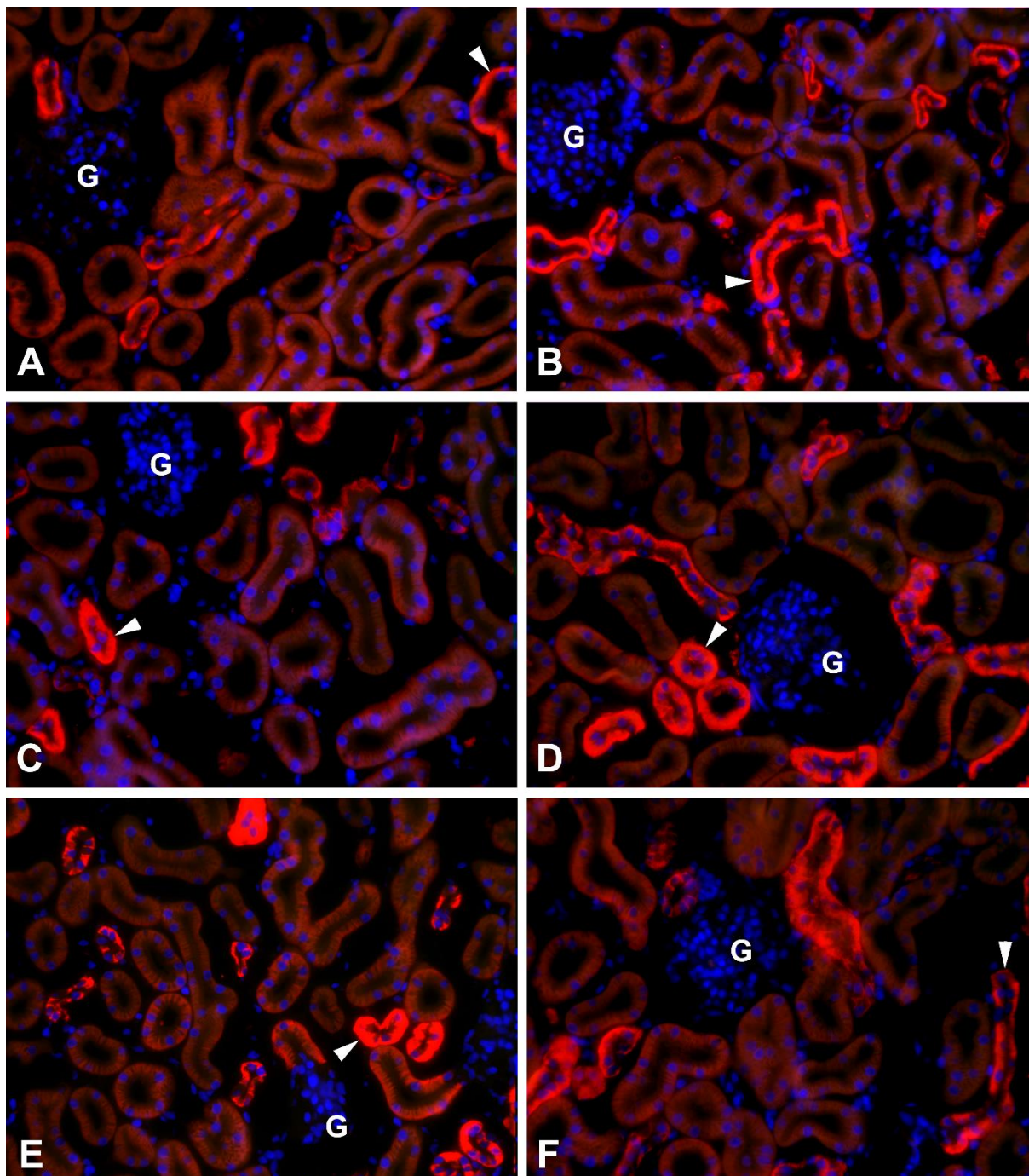
Rezultati 3-4 neovisna pokusa imunocitokemije, analize western blot i RT-PCR prikazani su reprezentativnom slikom. Brojčani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška, a podaci su statistički obrađeni Studentovim t-testom na razini vjerodostojnosti od  $P < 0.05$ . Za statističku obradu i grafički prikaz korišten je računalni program MS Excel (SAD).

## **4. REZULTATI**

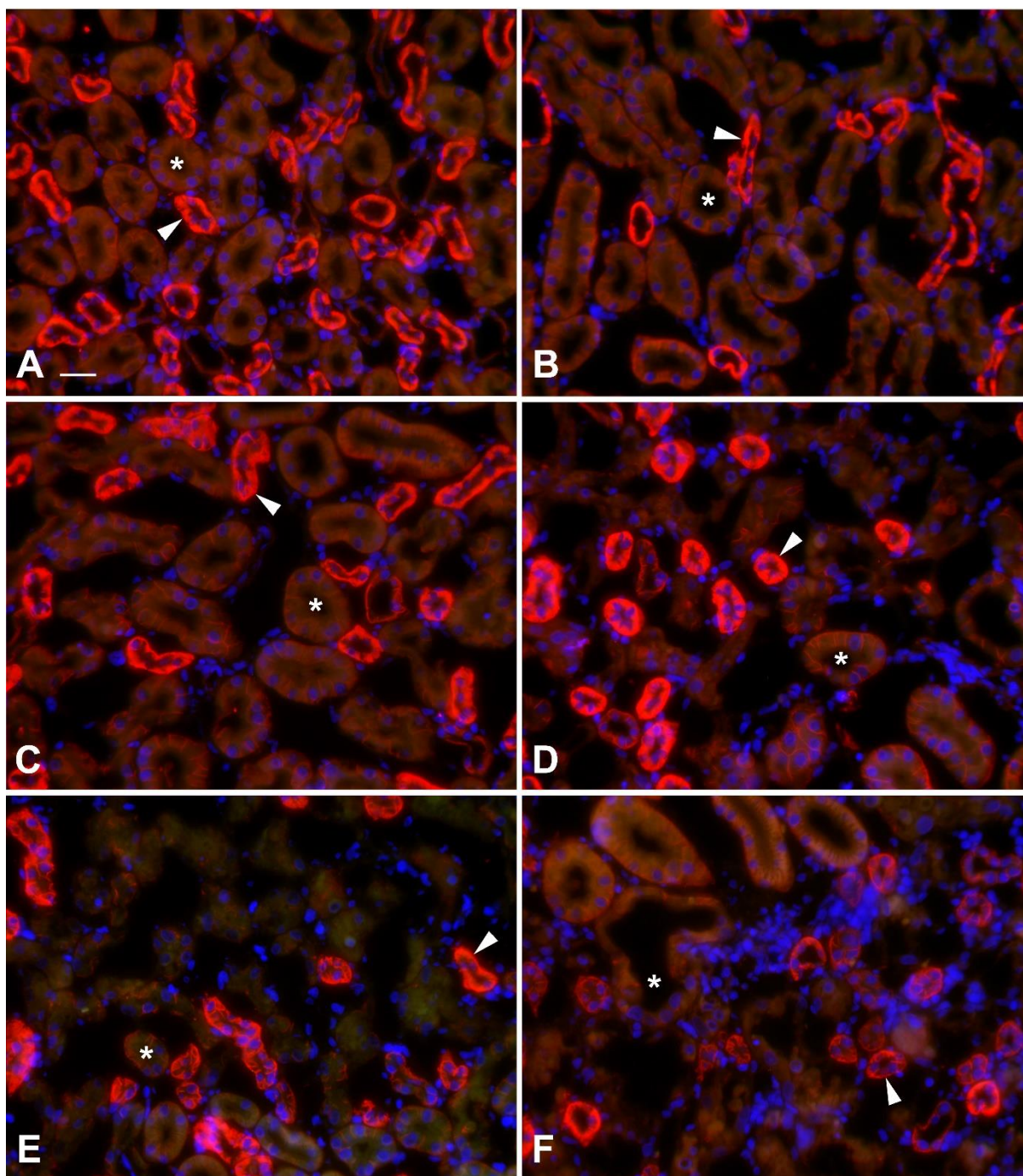
#### **4.1. Rezultati indirektne imunohistokemije na narescima fiksiranog tkiva bubrega**

Štakori su bili tretirani jednokratno cisplatinom. Za svaki dan nakon tretmana do petog dana izolirani su bubrezi. Također su bili izolirani bubrezi kontrolnoj skupini životinja koja nije dobivala tretman. Bubrezi su bili fiksirani i napravljeni su naresci na kriomikrotomu. Na narescima fiksiranog tkiva bubrega štakora koji su sadržavali koru i vanjsku srž napravila sam imunohistokemijska istraživanja koristeći monoklonsko protutijelo protiv  $\alpha_1$ -NaK ATPaze i sekundarno protutijelo s vezanom fluorescirajućom molekulom CY3. Ova tehnika korištena je na bubrezima izoliranima jedan, dva, tri, četiri i pet dana nakon davanja tretmana cisplatine i na kontrolnim bubrezima koji nisu bili tretirani. Detaljni postupak opisan je u poglavlju Materijali i metode. Rezultati su ovdje prikazani kao panel slika kontrole i svih 5 dana nakon tretmana. Napravila sam panele za koru (Slika 10) i vanjski tračak vanjske srži (Slika 11). Svaka slika je obrađena tako da su slike koje pokazuju crvenu fluorescenciju sekundarnog protutijela, zelenu fluorescenciju samoga tkiva i plavu fluorescenciju boje Hoechst 33342 za bojanje jezgra, preklopljene.





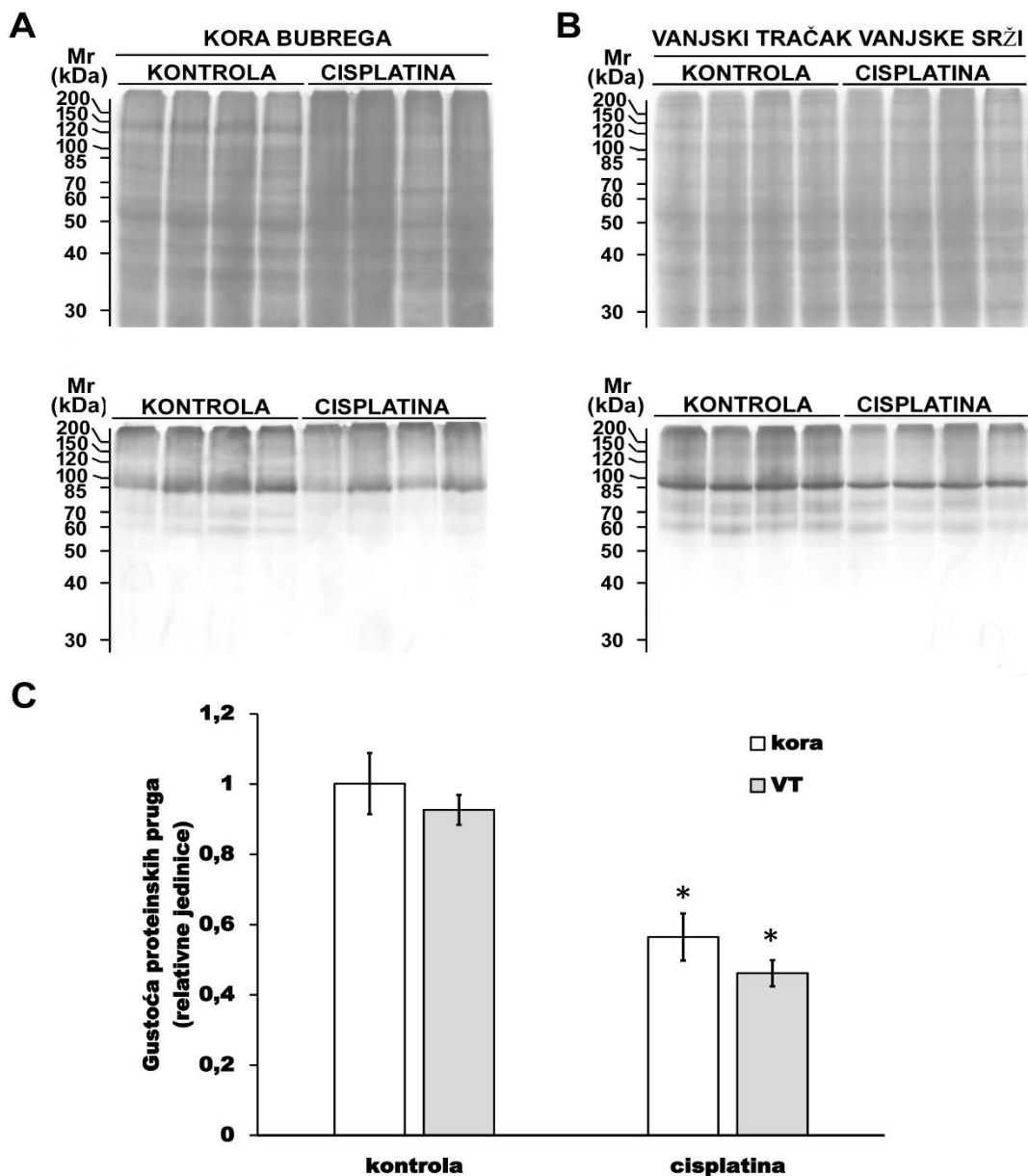
**Slika 10.** Prikaz Imunohistokemijskog obojenja  $\alpha_1$ -NaK ATPaze u kori bubrega. Crveno obojena je  $\alpha_1$ -NaK ATPaza, plavo su obojene jezgre. Na slici su glomeruli označeni s G, a Henleova petlja (s jakim crvenim obojenjem) označena je s vrhom strelice. Ostali kanalići na slici pripadaju S1 i S2 segmentima proksimalnog kanalića. Na panelu je usporedba kontrola (A), 1. dana nakon tretmana (B), 2. dana nakon tretmana (C), 3. dana nakon tretmana (D), 4. dana nakon tretmana (E) i 5. dana nakon tretmana (F).



**Slika 11.** Imunohistokemijski prikaz obojenja  $\alpha_1$ -NaK ATPaze u vanjskom tračku vanjske srži bubrega. Crveno obojena je  $\alpha_1$ -NaK ATPaza, plavo su obojene jezgre i zeleno je obojano tkivo kanalića. Na slici su zvjezdicom (\*) označeni S3 segmenti proksimalnog kanalića, a Henleova petlja (s jakim crvenim obojenjem) označena je s vrhom strelice. Na panelu je usporedba kontrola (A), 1. dana nakon tretmana (B), 2. dana nakon tretmana (C), 3. dana nakon tretmana (D), 4. dana nakon tretmana (E) i 5. dana nakon tretmana (F).

#### **4.2. Analiza ekspresije proteina $\alpha_1$ -NaK ATPaze u bubregu nakon tretmana cisplatinom metodom western blot**

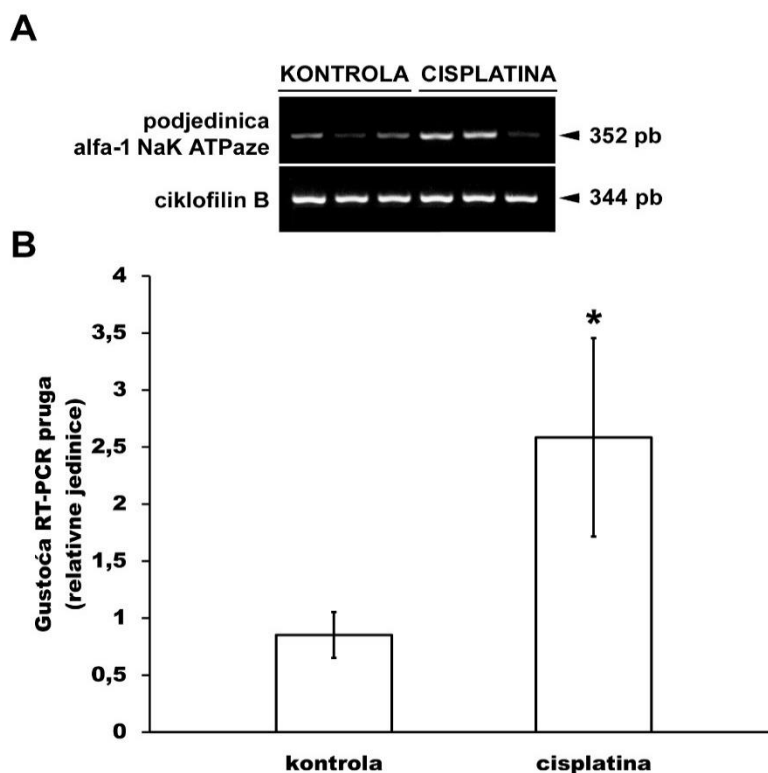
Analizu western blot provela sam na arhivskim uzorcima izoliranih ukupnih staničnih membrana. Analiza je napravljena na izolatima iz kore i vanjskog tračka vanjske srži bubrega pet dana nakon jednokratnog tretmana cisplatinom i bubrega kontrolnih životinja koje nisu dobile tretman. Postupaci dobivanja izolata ukupnih staničnih membrana i metode western blota opisani su u poglavlju Materijali i metode. Ovdje su rezultati prikazani kao slika membrana s prugom oko 97 kDa što odgovara  $\alpha_1$ -NaK ATPazi i graf usporedbe gustoće proteinskih pruga između tretiranog uzorka 5 dana nakon tretmana i kontrole kod kore i vanjskog tračka vanjske srži (Slika 12). Za izračun gustoće proteinskih pruga i statistiku radila sam 3 replike s po 4 tretirana uzorka i 4 kontrole za koru i VTVS. Također je prikazana slika gela nakon elektroforeze SDS-PAGE i bojanja proteina, što sam koristila za normiranje rezultata.



**Slika 12.** Rezultati western analize uzorka ukupnih staničnih membrana izoliranih iz kore i vanjskog tračka (VT) vanjske srži bubrega kod tretiranih i kontrolnih životinja. Prikaz A: slika gela nakon elektroforeze SDS-PAGE i bojanja proteina Coomassie bojom i slika membrane nakon western blota s prikazanim veličinama markera molekulskih masa; kontrola i tretirani uzorak izolata ukupnih staničnih membrana iz kore bubrega. Prikaz B: slika gela nakon SDS-PAGE elektroforeze i bojanja proteina i slika membrane nakon western blota s prikazanim veličinama markera molekulskih masa; kontrola i tretirani uzorak izolata ukupnih staničnih membrana iz vanjskog tračka vanjske srži bubrega. Na prikazima A i B na membrani vidljiva je pruga na oko 97 kDa koja odgovara  $\alpha_1$ -NaK ATPazi. Prikaz C: grafički prikaz usporedbe gustoća proteinskih pruga  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod kontrole i tretiranih uzoraka ukupnih staničnih membrana kore i vanjskog tračka vanjske srži (VT). Napravljene su 3 replike. Vidljiva je statistička značajnost pri  $p < 0,05$  (obilježeno zvjezdicom).

### **4.3. Analiza relativne ekspresije mRNA $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod tretmana cisplatinom dobivena metodom end-point RT-PCR-a**

Određivanje ekspresije gena radila sam na arhivskim uzorcima mRNA izolirane iz kore bubrega tretiranih životinja 5 dana nakon jednokratnog tretmana cisplatinom i kontrolnih životinja. Uzorci mRNA izolirani su iz kore bubrega i pročišćeni. Iz izolirane mRNA sintetizirana je cDNA koja je bila pohranjena i koju sam koristila u ovome pokusu. Dobivena cDNA umnožena je specifičnim početnicama i produkt je razdvojen elektroforezom na agaroznom gelu. Detaljni opis pokusa je u poglavlju Materijali i metode. Rezultati su ovdje prikazani kao slika gela s prikazanim vrpčama umnožene DNA gena za  $\alpha_1$ -NaK ATPazu (352 pb) i vrpčama umnožene DNA *ciklofilina B* (344 pb) koji je služio kao referentni gen te grafički prikaz usporedbe relativne ekspresije gena pomoću gustoće RT-PCR pruga dobivenih deztimerijom između tretmana i kontrole (Slika 13). Za statistiku i izračun gustoće RT-PCR pruga izvela sam 3 replike s po 3 tretirana i kontrolna uzorka.



**Slika 13.** Rezultati analize ekspresije gena dobivene umnažanjem cDNA dobivene iz mRNA  $\alpha_1$ -NaK ATPaze izolirane iz kore bubrega i usporedba relativne ekspresije između kontrole i tretiranog uzorka 5 dana nakon tretmana. Prikaz A: slika gela s vrpcama DNA  $\alpha_1$ -NaK ATPaze (352 pb) i vrpcama DNA ciklofilina B (344 pb), koji je služio kao referentni gen kod kontrole i tretiranog uzorka 5 dana nakon tretmana cisplatinom. Prikaz B: Grafički prikaz usporedbe relativne ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kontrole i tretiranih uzoraka. Za usporedbu ekspresije korištena je gustoća RT-PCR pruga dobivena denzitometrijskim mjerenjem pruga ciklosporina dobivenih na gelu nakon PCR-a. Korištene su 3 replike. Vidljiva je statistička značajnost pri  $p < 0,05$  (označeno zvjezdicom).

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Usporedba ekspresije $\alpha_1$ -NaK ATPaze u stanicama bubrega tretiranih cisplatinom i kontrolnih bubrega

U ovome istraživanju koristila sam metode imunohistokemije, western blota i RT-PCR-a kako bi usporedila ekspresiju  $\alpha_1$ -NaK ATPaze na razini mRNA i proteina kod bubrega štakora nakon tretmana cisplatinom i kontrolnih bubrega i pokazala promjena ekspresije kroz vrijeme nakon tretmana. Štakori su bili tretirani jednom dozom cisplatine u koncentraciji od 5 mg cisplatine/kg t.m. Uzorci za western blot i RT-PCR analizu uzimani su 5 dana nakon tretmana. Za imunohistokemiju uzimani su uzorci svakog dana od davanja tretmana do 5. dana.

Kod provedene western blot analize iz dobivenih rezultata može se vidjeti smanjenje količine proteina  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod cisplatinom tretiranih uzoraka u području kore i vanjskog tračka vanjske srži u odnosu na kontrolu.

Postoji dosta velika razlika u ekspresiji  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod uzoraka kore, čak ni kod kontrolnih uzoraka, dok je ekspresija u vanjskom tračku vanjske srži VTVS-u slična između uzoraka. Ovo može biti posljedica korištenja arhivskih umjesto svježih uzoraka.

U prijašnjem istraživanju pokazano je da su oboje podjedinice  $\alpha_1$  i  $\beta_1$  imale smanjenu ekspresiju kod fibroze i također da je smanjenje ekspresije  $\beta_1$ -NaK ATPaze važan dio procesa fibroze (Rajasekaran i sur., 2010). Ovdje smo pokazali smanjenje ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod tretmana cisplatinom. Istraga ekspresije  $\beta_1$ -NaK ATPaze kod cisplatinog tretmana također bi bila od velike važnosti. Nadalje istraživanja o povezanost same  $\alpha$  podjedinice i fibroze i EMT-a bila bi potrebna.

Smanjenje količine eksprimiranog proteina vidljiva je i iz imunohistokemijske analize. Na narescima tkiva kod vanjskog tračka vanjske srži vidljivo je veće smanjenje u ekspresiji nego kod kore. Iz imunohistokemijskih rezultata vidljivo je da upravo S3 segment proksimalnog kanalića ima najveći pad ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze. Ostali dijelovi nefrona u kori i vanjskom tračku ne pokazuju veliku promjenu u ekspresiji, S1 i S2 segmenti pokazuju malo smanjenje, Henleova petlja eksplicira puno  $\alpha_1$ -NaK ATPaze pa nije vidljivo ima li promjene u ekspresiji.

S3 segment također pokazuje općenito najveća oštećenja. Smanjenje ekspresije može biti i posljedica apoptoze stanica S3 segmenta, no na Slici 7 stanice u S3 segmentu prikazane su zelenom bojom, zajedno sa smanjenjem crvene fluorescencije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze.



Za razliku od ekspresije na azini proteina kod analize ekspresije mRNA  $\alpha$ 1-NaK ATPaze dobiveno je da je mRNA značajno više eksprimirana kod tretmana cisplatinom nego kod kontrole. Iako je mRNA izolirana samo iz kore, obzirom na povećanu razinu mRNA i smanjenu razinu proteina kod  $\alpha$ 1-NaK ATPaze moguće je da dolazi do smanjenja ekspresije posttranslacijski. U prijašnjem istraživanju pokazano je da na količinu podjedinice  $\beta$ <sub>1</sub> NaK ATPaze utječu posttranslacijski procesi, moguće je da isto vrijedi za podjedinicu  $\alpha$ <sub>1</sub> (Rajasekaran i sur., 2010). Daljnja istraživanja o procesima koji utječu na ekspresiju  $\alpha$ 1-NaK ATPaze bila bi od velike vrijednosti.

Ekspresija kod tretiranih uzoraka bila je relativno neravnomjerna. S obzirom da su korišteni arhivski uzorci nije jasno jesu li razlike u tretiranim uzorcima uzrokovane kvalitetom ili prirodom uzoraka. Pokus bi trebalo ponoviti na svježim uzorcima.

Ovi rezultati potvrđuju našu hipotezu o smanjenju ekspresije proteina  $\alpha$ 1-NaK ATPaze nakon tretmana cisplatinom u S3 segmentu nefrona. Rezultati analize western blot i imunohistokemijskog bojanja oboje jasno pokazuju smanjenje količine promatranog proteina. Također, rezultati imunohistokemijskog bojanja pokazuju da je smanjenje ekspresije najizraženije kod S3 segmenta proksimalnog kanalića.

## **5.2. Ekspresija $\alpha$ 1-NaK ATPaze kroz vrijeme nakon tretmana cisplatinom**

U ovome istraživanju pratili smo ekspresiju  $\alpha$ 1-NaK ATPaze kroz 5 dana nakon davanja tretmana cisplatinom. Promjenu ekspresije kroz dane promatrali smo imunohistokemijskom metodom kod kore i vanjskog tračka vanjske srži.

Kod kore su vidljivi S1 i S2 segmenti proksimalnog kanalića koji pokazuju malo smanjenje ekspresije kroz 5 dana u kojima su promatrani. Veće promjene u ekspresiji  $\alpha$ 1-NaK ATPaze vidljive su kod vanjskog tračka vanjske srži. Jasno je vidljiv pad ekspresije kroz dane, osim kod 5. dana koji pokazuje sličnu ekspresiju kao 4. dan. Kod obje regije pad ekspresije vidljiv je oko trećeg dana nakon tretmana cisplatinom.

Struktura S3 segmenta proksimalnog kanalića pokazuje veća oštećenja od S1 i S2 segmenata kod kojih nisu vidljive veće promjene same strukture kod ovih segmenata. Također kod svih segmenata vidljivo je povećanje i promjene na jezgrama kao posljedice genotoksičnosti cisplatinom. Promjene su najizraženije kod S3 segmenta. Opažene razlike slažu

se s poznatim razlikama u osjetljivosti ovih segmenata nefrona na nefrotoksične spojeve (Ljubojević, 2003).

Slično strukturirano istraživanje u kojem bi se pratila ekspresija markera EMT-a, poput  $\alpha$ -SMA i fibronektina, nakon tretmana cisplatinom moglo bi dati još više informacija o ulozi EMT-a i fibroze na odgovor bubrega na cisplatinsku nefrotoksičnost (Kalluri i Weinberg, 2009). Također smatram da bi trebalo provesti istraživanja s trajanjem dužim od 5 dana i manjim koncentracijama cisplatine kako bi se mogla vidjeti promjena kroz duže vrijeme i postupan nastup fibroze kao posljedice tretmana cisplatinom i uloge NaK ATPaze u njenom nastajanju.

## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog preliminarnog istraživanja bio je istražiti na arhivskim uzorcima promjenu ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze kod bubrega pet dana nakon jednokratnog tretmana s 5 mg cisplatine/kg t.m. i vidjeti promjenu ekspresije tijekom vremena kroz 5 dana nakon tretmana.

Moja hipoteza o smanjenju ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze bila je djelomično potvrđena. Rezultati su pokazali da dolazi do smanjenja ekspresije  $\alpha_1$ -NaK ATPaze na razini proteina, dok se na razini mRNA ekspresija povećava. Rezultati su također potvrdili pretpostavku da je smanjenje ekspresije najizraženije kod S3 segmenta proksimalnog kanaliće nefrona u vanjskom tračku vanjske srži bubrega. Uz ovo vidljivo je iz vremenskog tijeka pada ekspresije da je počeo oko 3. dana nakon davanja tretmana.

Uz ovo, daljnja istraživanja na drugim markerima EMT-a mogu razotkriti više o procesu epitelno-mezenhimske tranzicije i fibroze bubrega kod tretmana cisplatinom. Sa boljim razumijevanjem ovih procesa koji dovode do dugotrajnog i progresivnog oštećenja bubrega moguće je doći do boljih načina sprječavanja i liječenja nuspojava koje nastaju kao posljedice nefrotoksičnosti cisplatine.

## **7. LITERATURA**

- Böttger P, Doğanlı C, Lykke-Hartmann K. (2012) Migraine- and dystonia-related disease-mutations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases: relevance of behavioral studies in mice to disease symptoms and neurological manifestations in humans. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:855-71.
- Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. (2017) The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol.* 8:371.
- Ghosh S. (2019) Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 88:102925.
- He J, Xu Y, Koya D, Kanasaki K. (2013) Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 17:488-97.
- Ishikawa T, Ali-Osman F. (1993) Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem.* 268:20116-25.
- Kalluri R, Neilson EG. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 112:1776-84.
- Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119:1420-8.
- Kartalou M, Essigmann JM. (2001) Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res.* 478:1-21.
- Kriz W, Kaissling B. (2008). Structural Organization of the Mammalian Kidney. Seldin and Giebisch's The Kidney. 1:479-563.
- Lote CJ. (2012) Principles of Renal Physiology. Fifth edition. Springer New York, NY.
- Ljubojević M. (2003) Uzroci poliurije u cisplatinskoj nefrotoksičnosti u štakora, magistarski rad.
- Martinho N, Santos TCB, Florindo HF, Silva LC. (2019) Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity. *Front Physiol.* 9:1898.
- Meyer KB, Madias NE. (1994) Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab.* 20:201-13.

- Okuda M, Tsuda K, Masaki K, Hashimoto Y, Inui K. (1999) Cisplatin-induced toxicity in LLC-PK1 kidney epithelial cells: role of basolateral membrane transport. *Toxicol Lett.* 106:229-35.
- Parks LD, Zalups RK, Barfuss DW. (2000) Luminal and basolateral membrane transport of glutathione in isolated perfused S(1), S(2), and S(3) segments of the rabbit proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 11:1008-1015.
- Pirahanchi Y, Jessu R, Aeddula NR. (2022) Physiology, Sodium Potassium Pump. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537088/> (Pristupljeno 26. 9. 2022.).
- PubChem, (2004) National Center for Biotechnology Information, National Library Of Medicine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-Platin> (Pristupljeno 27. 9. 2022.).
- Rajasekaran SA, Huynh TP, Wolle DG, Espineda CE, Inge LJ, Skay A, Lassman C, Nicholas SB, Harper JF, Reeves AE, Ahmed MM, Leatherman JM, Mullin JM, Rajasekaran AK. (2010) Na,K-ATPase subunits as markers for epithelial-mesenchymal transition in cancer and fibrosis. *Mol Cancer Ther.* 9:1515-24.
- Safirstein R, Winston J, Moel D, Dikman S, Guttenplan J. (1987) Cisplatin nephrotoxicity: insights into mechanism. *Int J Androl.* 10:325-46.
- Schnellmann RG. (2013) Toxic Responses of the Kidney. In: Klaassen CD. eds. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Osmo izdanje. McGraw Hill; <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=958&sectionid=53483736> (Pristupljeno 30. 9. 2022.).
- Sharp CN, Doll MA, Megyesi J, Oropilla GB, Beverly LJ, Siskind LJ. (2018) Subclinical kidney injury induced by repeated cisplatin administration results in progressive chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 315:161-172.
- Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M. (2003) Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int.* 63:72-82.

- Tulub AA, Stefanov VE. (2001) Cisplatin stops tubulin assembly into microtubules. A new insight into the mechanism of antitumor activity of platinum complexes. *Int J Biol Macromol.* 28:191-8.
- van de Water B, Tijdens IB, Verbrugge A, Huigsloot M, Dihal AA, Stevens JL, Jaken S, Mulder GJ. (2000) Cleavage of the actin-capping protein alpha -adducin at Asp-Asp-Ser-Asp633-Ala by caspase-3 is preceded by its phosphorylation on serine 726 in cisplatin-induced apoptosis of renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 275:25805-13.
- Yu A, Chertow G, Luyckx V, Marsden P, Skorecki K, Taal M. (2019) *Brenner and Rector's The Kidney.* Eleventh Edition. Elsevier, Philadelphia.



## **Životopis**

Daria Sudac rođena je 27. kolovoza 1998. godine u Karlovcu. Od prvog do osmog razreda pohađala je Osnovnu školu Dubovac. Upisala je prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Gimnaziji Karlovac 2013. godine i sve četiri godine završila je s odličnim uspjehom. Nakon položene mature 1. listopada 2017. godine upisala je preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Preddiplomski studij završila je 23. rujna 2020. godine s ukupno 181 ECTS bodova i težinskim prosjekom ocjena od 3,834, čime je stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice molekularne biologije. Nakon završenog preddiplomskog studija 14. listopada 2020. godine upisala je diplomski studij Molekularne biologije na istom fakultetu. Tijekom druge godine diplomskog studija u sklopu predmeta Stručna praksa odrađivala je praksu u Zoološkom vrtu grada Zagreba.