

Bubrežni fenotip miša s isključenim genom St8sia1

Živatović, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:597059>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Karlo Živatović

**BUBREŽNI FENOTIP MIŠA S
ISKLUČENIM GENOM *ST8SIA1***

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Karlo Živatović

**BUBREŽNI FENOTIP MIŠA S
ISKLUČENIM GENOM *ST8SIA1***

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Marija Heffer.

Rad ima 41 list, 2 tablice i 15 slika.

Zahvala.

Želim prije svega zahvaliti svojim roditeljima koji su na ovom putovanju bili sa mnom od samoga početka i koji su mi bili ogromna podrška.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer na pruženoj prilici u sudjelovanju u ovom istraživanju.

Zahvaljujem se dr. sc. Vedrani Ivić na svom utrošenom vremenu i strpljenju i Miloradu Zjaliću na pomoći oko izrade statistike.

Hvala mojim kolegama i prijateljima s fakulteta koji su me bodrili sve ove godine i hvala mojoj djevojci koja mi je bila najveća podrška.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Epitelne stanice i njihova stanična membrana..... | 1 |
| 1.2. Uloga lipidnih splavi u staničnoj membrani | 1 |
| 1.3. Gangliozidi | 2 |
| 1.4. Biosinteza glikosfingolipida | 3 |
| 1.5. <i>St8sial1</i> gen..... | 5 |
| 1.5.1. Posljedice nedostatka gena za enzim gangliozid GD3 sintazu i uloga gangliozida u patogenezi bolesti..... | 5 |
| 2. HIPOTEZA | 7 |
| 3. CILJ RADA | 8 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 9 |
| 4.1 Ustroj studije..... | 9 |
| 4.2 Materijal..... | 9 |
| 4.3 Metode | 9 |
| 4.3.1. Rezanje tkiva na kriostatu | 10 |
| 4.3.2. Fluorescentna imunohistokemija..... | 10 |
| 4.3.3. Mikroskopiranje i kvantifikacija | 14 |
| 4.3.4. Hemalaun-eozin bojenje tkiva i mikroskopiranje | 14 |
| 4.3.5. Mjerenje koncentracije proteina u urinu WT i KO miševa | 15 |
| 4.3.6. Statističke metode | 16 |
| 5. REZULTATI..... | 17 |
| 5.1. Morfologija bubrega KO miševa u odnosu na WT miševe | 17 |
| 5.2. Analiza koncentracije proteina u urinu..... | 18 |
| 5.3. Analiza raspodjele gangliozida u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe..... | 18 |
| 5.3.1. Analiza raspodjele GM3..... | 20 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.3.2. | Analiza raspodjele GM1 | 21 |
| 5.3.3. | Analiza raspodjele GD1a | 22 |
| 5.4. | Analiza raspodjele flotilina-1 i transferinskog receptora u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe | 23 |
| 5.4.1. | Analiza raspodjele flotilina-1 | 25 |
| 5.4.2. | Analiza raspodjele transferinskog receptora | 26 |
| 5.4.3. | Usporedba raspodjele flotilina-1 i transferinskog receptora prema raspodjeli gangliozida između WT i KO miševa..... | 27 |
| 5.5. | Analiza raspodjele akvaporina-1 i 2 u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe..... | 27 |
| 5.5.1. | Analiza raspodjele akvaporina-1 | 29 |
| 5.5.2. | Analiza raspodjele akvaporina-2..... | 29 |
| 6. | RASPRAVA | 31 |
| 6.1. | Morfologija bubrega WT i KO miševa..... | 31 |
| 6.2. | Koncentracija proteina u urinu WT i KO miševa..... | 31 |
| 6.3. | Raspodjela gangliozida u bubrezima WT i KO miševa | 32 |
| 6.4. | Raspodjela flotilina-1 i transferinskog receptora u bubrezima WT i KO miševa | 33 |
| 6.5. | Raspodjela akvaporina-1 i 2 u bubrezima WT i KO miševa..... | 34 |
| 7. | ZAKLJUČAK | 35 |
| 8. | SAŽETAK | 36 |
| 9. | SUMMARY | 37 |
| 10. | LITERATURA..... | 38 |
| 11. | ŽIVOTOPIS | 41 |

POPIS KRATICA:

AMDCC – Konzorcijum životinjskih modela s dijabetičkim komplikacijama, engl. *Animal models of diabetic complications consortium*,

CerS – ceramid sintaza, engl. *ceramide synthase*,

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*,

EGF – epidermalni faktor rasta, engl. *epidermal growth factor*,

ER – endoplazmatski retikulum, engl. *endoplasmic reticulum*,

FITC – fluorescein izotiocijanat, engl. *fluorescein isothiocyanate*,

GalCer – galaktozilceramid, engl. *galactosylceramide*,

GFR – brzina glomerularne filtracije, engl. *glomerular filtration rate*,

GlcCer – glukozilceramid, engl. *glucosylceramide*,

GPI – glikozilfosfatidilinozitol, engl. *glycosylphosphatidylinositol*,

GPI-APs - proteini vezani za glikozilfosfatidilinozitolno sidro, engl. *glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins*,

GSL – glikosfingolipid, engl. *glycosphingolipid*,

KO – genetički izmijenjen organizam s posljedičnim gubitkom funkcije određenog gena, engl. *knockout*,

LacCer – laktozilceramid, engl. *lactosylceramide*,

SDS-PAGE – natrij dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza, engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

STZ – streptozotocin, engl. *streptozotocin*,

TGN – trans-Golgi odjeljak, engl. *trans-Golgi network*,

TRITC – tetrametilrodamin, engl. *tetramethylrhodamine*,

UDP – uridin difosfat, engl. *uridine diphosphate*,

WT – divlji tip, engl. *wild type*.

POPIS SLIKA:

| | |
|--|----|
| Slika 1. Struktura sfingozina, ceramidnog lipidnog sidra i galaktozilceramida. | 3 |
| Slika 2. Biosinteza glikosfingolipida. | 4 |
| Slika 3. Morfologija bubrega WT i KO miševa prikazana hemalaun-eozin bojenjem..... | 17 |
| Slika 4. Vizualizacija proteina u urinu miševa. | 18 |
| Slika 5. Raspodjela GM3 i GM1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. | 19 |
| Slika 6. Raspodjela GD1a u kori i srži bubrega WT i KO miševa. | 20 |
| Slika 7. Grafički prikaz raspodjele GM3 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. | 21 |
| Slika 8. Grafički prikaz raspodjele GM1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. | 22 |
| Slika 9. Grafički prikaz raspodjele GD1a u kori i srži bubrega WT i KO miševa. | 23 |
| Slika 10. Raspodjela flotilina-1 i transferinskog receptora u kori i srži bubrega WT i KO miševa..... | 24 |
| Slika 11. Grafički prikaz raspodjele flotilina-1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa..... | 25 |
| Slika 12. Grafički prikaz raspodjele transferinskog receptora u kori i srži bubrega WT i KO miševa..... | 26 |
| Slika 13. Raspodjela akvaporina-1 i 2 u kori i srži bubrega WT i KO miševa..... | 28 |
| Slika 14. Grafički prikaz raspodjele akvaporina-1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa..... | 29 |
| Slika 15. Grafički prikaz raspodjele akvaporina-2 u kori i srži bubrega WT i KO miševa..... | 30 |

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemiji. 13
Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemiji 14

1. UVOD

1.1. Epitelne stanice i njihova stanična membrana

Epitelne stanice predstavljaju tip stanica u organizmu koje, kada su udružene, tvore slojeve različitih debljina koji pokrivaju površinu tijela i organa (1). Postoji više vrsta epitelnih stanica koje obavljaju određene uloge u organizmu, kao što su selektivna difuzija, apsorpcija, zaštita i sekrecija (2). Ovako udružene, morfološki i fiziološki istovrsne stanice zajedničkog porijekla tvore epitelno tkivo koje predstavlja jedno od četiri osnovna tipa tkiva u organizmu, zajedno s vezivnim, mišićnim i živčanim tkivom (3).

Stanične su membrane strukture koje odvajaju unutarnji okoliš stanice od njezine okoline. Strukturni temelj staničnih membrana svih eukariotskih stanica, pa tako i epitelnih, jest fosfolipidni dvosloj i njemu pridruženi proteini koji mogu imati različite uloge, od kanalnih proteina i proteinskih nosača koji omogućuju selektivni transport molekula kroz membranu, do proteina koji služe kao receptori za izvanstanične signale te nadziru komunikaciju između stanica (1).

Jedna od glavnih karakteristika epitelnih stanica višestaničnih organizama, posebice onih u proksimalnim tubulima bubrega, jest istovremeni kontakt s unutrašnjosti organizma i lumenom organa iz kojega uzimaju hranjive tvari koje dolaze iz okoliša. Za takve se stanice kaže da su strukturno polarizirane, a stanična membrana takvih stanica podijeljena je u dva područja: bazolateralno područje, koje je okrenuto prema unutrašnjosti organizma i na kojem se nalazi niz receptora koji omogućavaju komunikaciju s udaljenim dijelovima organizma i apikalno područje, koje je okrenuto prema lumenu organa i služi kao selektivni filter. Pri tome, apikalni dio membrane štiti organizam od štetnih tvari, dok u isto vrijeme uzima hranjive tvari iz okoliša. Ovakve membrane se nazivaju „četkastim membranama“ i građene su od gusto formiranih mikrovila (1, 4).

1.2. Uloga lipidnih splavi u staničnoj membrani

Osim fosfolipida i proteina, glikolipidi i kolesterol također imaju važnu ulogu u građi i normalnoj funkciji staničnih membrana eukariotskih stanica. Dok glikolipidi čine tek 2 %

ukupnih lipida staničnih membrana kolesterol svojim molarnim udjelom, uz fosfolipide, predstavlja glavnu komponentu staničnih membrana eukariotskih stanica. Sfingomijelin jedan je od lipidnih spojeva koji imaju važnu strukturnu ulogu u membranama eukariotskih stanica, a posebice u membranama aksona živčanih stanica (1).

U staničnim membranama eukariotskih stanica lipidi i proteini nisu uniformno raspoređeni, već postoje područja na kojima dolazi do formiranja lipidnih mikrodomena koje su organizirane oko glikolipoproteina. Te lipidne mikrodomene, koje su u najvećoj mjeri građene od kolesterola i sfingomijelina, nazivaju se lipidne splavi (4, 5).

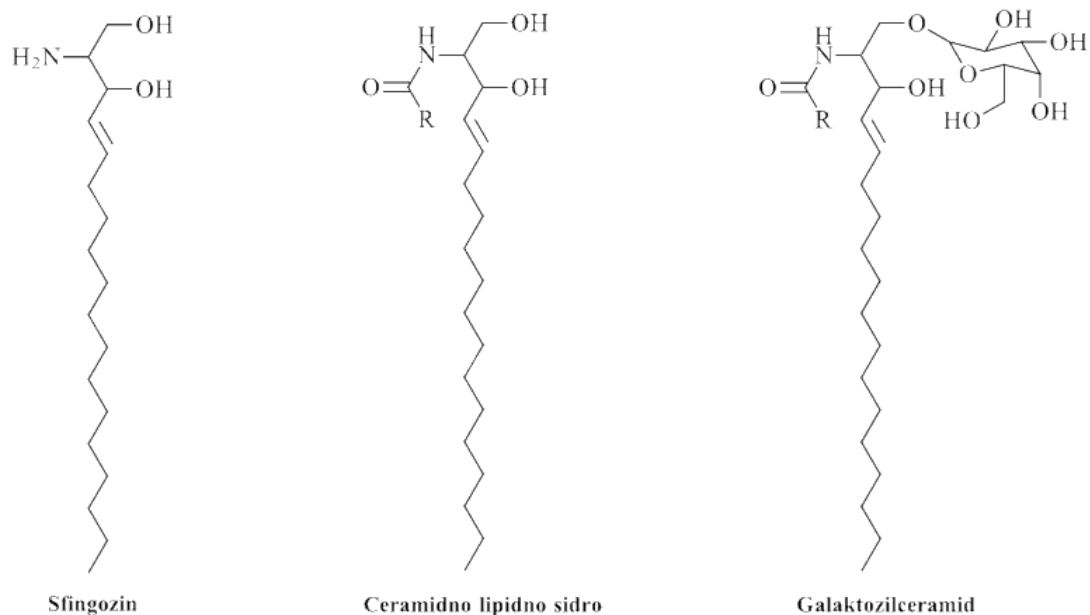
Iako se u početku smatralo da je glavna uloga lipidnih splavi u transportu proteina i lipida, danas se pretpostavlja da služe kao središta za oblikovanje signalnih domena. Također, imaju važnu ulogu u kontroliranju neurotransmisije, endocitoze, apoptoze i reguliranju proteolize (4). Proteini lipidnih splavi mogu biti usidreni u staničnoj membrani putem lipidnog i glikolipidnog sidra, kakvo je recimo glikozilfosfatidilinozitolno (engl. *glycosylphosphatidylinositol*, GPI) sidro. Proteini vezani za glikozilfosfatidilinozitolno sidro (engl. *glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins*, GPI-APs) su rasprostranjeni u lipidnim splavima i imaju važnu ulogu u reguliranju adhezije i polarizacije leukocita (6, 7).

1.3. Ganglioziidi

Ganglioziidi su glikosfingolipidi (engl. *glycosphingolipid*, GSL) građeni od ceramidnog lipidnog sidra i šećernog lanca s jednom ili više sijalinskih kiselina. GSL-ovi se mogu nalaziti u većim količinama u staničnoj membrani, kao što je to slučaj kod membrana aksona živčanih stanica gdje čine više od 20 % ukupnih membranskih lipida, ili u manjim količinama kao što je to u membranama eritrocita gdje čine manje od 5 % ukupnih membranskih lipida. GSL-ovi nisu podjednako rasprostranjeni u staničnim membranama, već su koncentrirani u lipidnim splavima (8).

Postoji više od 60 vrsta GSL-a koji se razlikuju jedni od drugih prema sastavu šećernog lanca, odnosno broju i poziciji sijalinske kiseline. GSL-ovi imaju različite uloge u stanici. GM3, koji je najzastupljeniji u bubrežnom tkivu, igra važnu ulogu u održavanju naboj-selektivne filtracijske membrane glomerula. Oligosaharidne kemijske skupine GSL-a, koje se nalaze u izvanstaničnom prostoru, služe kao specifične determinante u staničnom prepoznavanju i

komunikaciji između stanica. Zbog toga imaju važnu ulogu u rastu i diferencijaciji stanica i tkiva. (9). Tako je recimo GM1 odgovoran za normalnu mijelinizaciju (10).

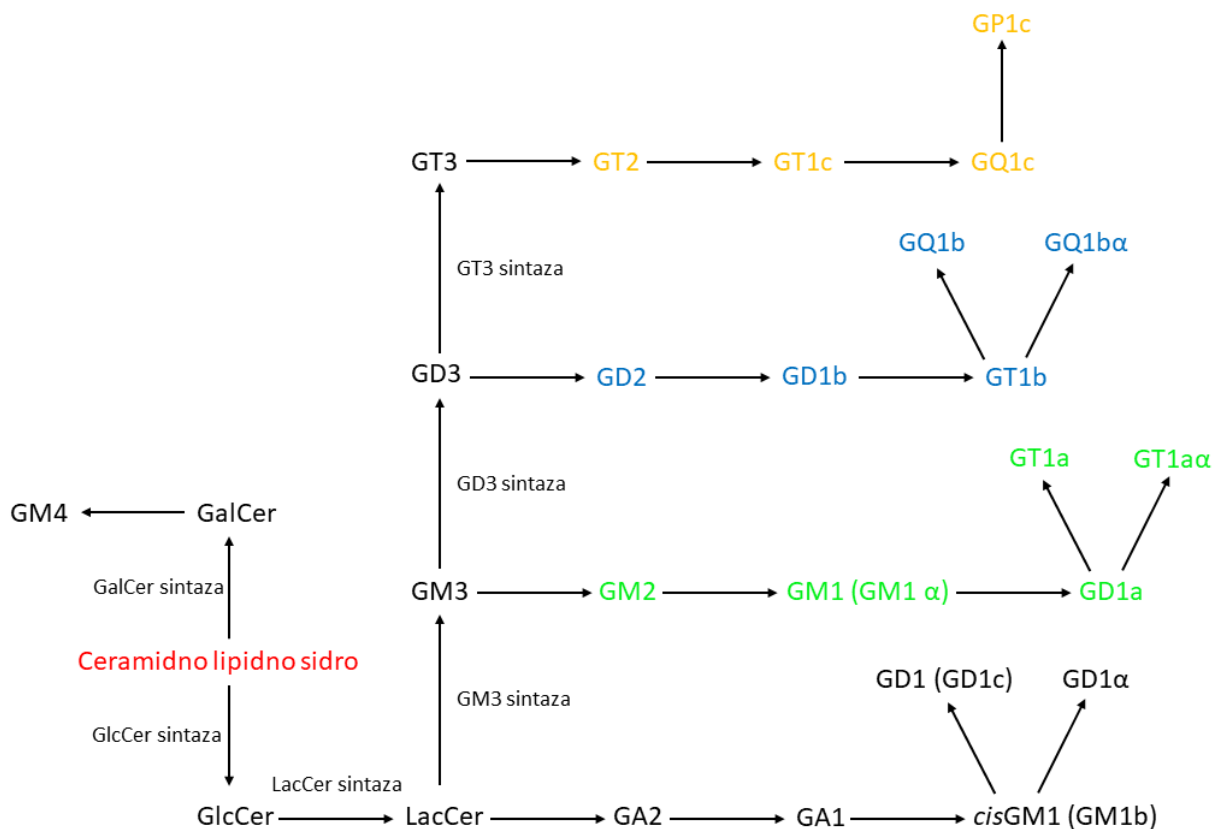


Slika 1. Struktura sfingozina, ceramidnog lipidnog sidra i galaktozilceramida. Ceramidno lipidno sidro čini strukturni temelj svih glikosfingolipida (engl. *glycosphingolipid*, GSL) životinjskih stanica. Građeno je od aminoalkohola sfingozina na kojega je vezana određena masna kiselina. Ceramidno lipidno sidro prolazi kroz proces glikozilacije pri čemu nastaju glukozilceramid (engl. *glucosylceramide*, GlcCer) i galaktozilceramid (engl. *galactosylceramide*, GalCer). GlcCer i GalCer su prethodnici svih GSL-ova koji se sintetiziraju u Golgijevom aparatu eukariotskih stanica. Izradio autor.

1.4. Biosinteza glikosfingolipida

Biosinteza GSL-a započinje procesom kondenzacije sfingozina s molekulom acetil koenzima A. Kao produkt reakcije nastaje ceramidno lipidno sidro koje čini strukturni temelj svih GSL životinjskih stanica (11). Nastanak produkta katalizira enzim koji se naziva ceramid sintaza (engl. *ceramide synthase*, CerS), a koji pripada u obitelj istoimenih enzima koji dijele jednaka svojstva kao što je katalitički mehanizam, unutarstanični smještaj i kemijska struktura (12). Ta reakcija, koja predstavlja početak sinteze osnovnih oblika GSL-a, odigrava se u endoplazmatskom retikulumu (engl. *endoplasmic reticulum*, ER) (13). Ceramidno lipidno sidro može se koristiti za sintezu galaktozilceramida (engl. *galactosylceramide*, GalCer) ili glukozilceramida (engl. *glucosylceramide*, GlcCer). GalCer se sintetizira reakcijom

galaktozilacije ceramidnog lipidnog sidra pri čemu se galaktoza prenosi s uridin difosfat galaktoze (engl. *uridine diphosphate*, UDP) na prvu hidroksilnu grupu ceramidnog lipidnog sidra pomoću enzima koji se naziva GalCer sintaza. Sinteza GlcCer-a započinje transportom ceramidnog lipidnog sidra u Golgijev aparat, točnije u njegov cis-odjeljak. Reakciju glukozilacije ceramidnog lipidnog sidra katalizira GlcCer sintaza pri čemu nastaje GlcCer (14). GlcCer se dalje koristi za sintezu kompleksnijih oblika GSL-a koji će se sintetizirati u staničnoj membrani trans-odjeljka Golgijevog aparata (engl. *trans Golgi network*, TGN) u nizu reakcija koje kataliziraju enzimi iz obitelji trans-Golgi odjeljak specifičnih glikoziltransferaza (11, 14). Zadnji korak prije sinteze kompleksnijih GSL-a sinteza je laktozilceramida (engl. *lactosylceramide*, LacCer). LacCer je GSL koji čini središte sinteze svih GSL-a iz a, b i c serije. (Slika 2.). Sintetizira se reakcijom galaktozilacije GlcCer-a koju katalizira enzim LacCer sintaza (8, 11).



Slika 2. Biosinteza glikosfingolipida (engl. *glycosphingolipid*, GSL). Glukozilceramid (engl. *glucosylceramide*, GlcCer) sintetizira se u Golgijevom aparatu te će iz njega nastati laktozilceramid (engl. *lactosylceramide*, LacCer) koji čini metaboličko središte za sintezu svih ostalih, složenijih GSL-a a, b i c serija. **Legenda:** Zelena boja – GSL serije a, plava boja – GSL serije b, žuta boja – GSL serije c. Izradio autor.

1.5. *St8sial* gen

St8sial gen je gen koji se nalazi na p kraku 12. kromosoma. Kodira enzim gangliozid GD3 sintazu koji je zaslužan za sintezu gangliozida GD3 i GT3, koji su preteče GSL-a b i c serija (Slika 2.). Ključni korak u njihovoj sintezi prijenos je sijalinske kiseline na GM3, reakcija koju katalizira gangliozid GD3 sintaza (15). Enzim se nalazi u Golgijevom aparatu te osim u metabolizmu sfingolipida, sudjeluje i u reakcijama posttranslacijskih modifikacija proteina, točnije u reakcijama proteinske glikozilacije (16).

1.5.1. Posljedice nedostatka gena za enzim gangliozid GD3 sintazu i uloga gangliozida u patogenezi bolesti

Prema shemi biosinteze GSL-a (Slika 2.) lako je pretpostaviti posljedice nedostatka gangliozid GD3 sintaze. Ako nedostaje gen koji kodira taj enzim, neće doći do sinteze GD3 i GT3, a pri tome niti ostalih GSL-a kojima su ti isti preteče, a to su svi GSL-i b i c serija. Pri tome će doći do nakupljanja GM3 i svih onih do čije sinteze dolazi prije bloka, a to su GSL-i serije a. Uloga GSL-a u patogenezi bolesti se temelji na činjenici da neuravnoteženost u sintezi GSL-a, koja se događa u slučaju nedostatka *St8sial* gena, dovodi do poremećaja raspodjele proteina lipidnih splavi kao što su epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) i inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin like growth factor*, IGF-1) (9, 17). Istraživanja su dokazala da je odstupanje od uobičajene sinteze GSL-a prisutno u patološkim stanjima kao što su tip 1 i 2 diabetesa mellitusa pri čemu je došlo do povišene koncentracije GM3 u proksimalnim i distalnim tubulima bubrega. Ovo istraživanje pokazalo je da GM3 ima važnu ulogu u patogenezi dijabetičke nefropatije (9). Nadalje, dokazani su utjecaji manjka određenih GSL-a u patološkim stanjima živčanog sustava. Manjak GSL-a serije b, točnije GT1b, dovodi do neurodegeneracije. Također je dokazano da manjak ili gubitak kompleksnih GSL-a iz serije b ometa funkciju mikturicijskih središta u mozgu. Kao posljedica toga dolazi do mokraćne retencije i nepotpunog ispražnjavanja mokraćnog mjehura uslijed gubitka funkcije detruzorskog mišića, koja nastaje kao posljedica deinervacije mokraćnog mjehura (10). Patološki utjecaj manjka GSL-a b serije dokazan je i na životinjskim modelima s isključenim genom (engl. *knockout*, KO) za enzim GD3 sintaza na kojima je pokazano da središnju ulogu u neurodegeneraciji kralježnične moždine ima sustav komplementa, odnosno

njegova aktivacija. Također, model je pokazivao manjak motoričkih neurona te abnormalno nakupljanje mikroglia stanica u kralježničnoj moždini (18). Dokazano je također da nakupljanje GM3 inhibira regeneraciju mezangijalnih stanica i bubrežnih pericita te da ima negativan učinak na signalni put posredovan inzulinom i pri tome ima potencijalnu ulogu u razvitku diabetesa mellitusa tipa 2 (17).

2. HIPOTEZA

U miševa s isključenim *St8sial* genom dolazi do poremećaja sastava lipidnih splavi bubrežnog epitela što se očituje promjenama u raspodjeli markera lipidnih splavi flotilina i molekula potrebnih za funkciju bubrega kao što su akvaporini. Promjene u raspodjeli postaju vidljive tijekom sazrijevanja bubrega.

3. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- a) klasičnim histološkim bojenjima prikazati morfologiju bubrega miševa s isključenim genom *St8sial1* (KO) u odnosu na miševe divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) starosti 5, 15 i 30 dana.
- b) Izmjeriti koncentraciju proteina u urinu KO miševa u odnosu na WT miševe.
- c) Protutijelima na gangliozide prikazati raspodjelu gangliozida u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe.
- d) Protutijelima na markere lipidnih splavi i ne-splavi prikazati odnos raspodjele markera prema raspodjeli gangliozida u KO miševa prema WT miševima.
- e) Protutijelima na akvaporine i markere lipidnih splavi i ne-splavi odrediti položaj akvaporina u bubrežima starim 5, 15 i 30 dana.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Ustroj studije

Studija parova – životinje divljeg tipa prema životinjama s isključenim genom *St8sial1*.

4.2 Materijal

U istraživanju je korišteno tkivo bubrega WT miševa i KO miševa kojima je isključen *St8sial1* gen. Obje skupine obuhvaćaju životinje starosti 5, 15 i 30 dana. Istraživanje je dio HRZZ projekta „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ (IP-2014-09-2324) voditeljice prof. dr. sc. Marije Heffer te ima Etičko dopuštenje Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (klasa 641-01/15-01/49, broj: 525-61-07-15-07).

4.3 Metode

Nakon uzorkovanja uzorci su fiksirani 4 %-tnim paraformaldehidom, krioprotektirani u saharozi te smrznuti u pothlađenom izopentanu. Napoljetku su pohranjeni na -80 °C do rezanja. Fiksirani uzorci su narezani na kriostatu na debljinu od 20 µm te su zalijepljeni na predmetna stakalca presvučena želatinom. U tkivu je pokazana raspodjela gangliozida protutijelima na gangliozide (anti-GM3, anti-GM1 i anti-Gd1a) te raspodjela biljega lipidnih splavi (protutijelom na flotilin-1) i biljega ne-splavi (protutijelom na transferinski receptor). Akvaporini su dokazani protutijelima na akvaporin-1 i akvaporin-2. Dvostruka imunofluorescentna bojenja napravljena su korištenjem sekundarnih protutijela obilježenih crvenom i zelenom fluoroforom. Tkiva su slikana digitalnim fotoaparatom koji je spojen s mikroskopom s fluorescentnim izvorom svjetlosti te su dobivene slike kvantificirane korištenjem računalnog programa FIJI (19).

Na ostatku tkiva prikazana je morfologija bubrega klasičnim histološkim bojenjem hemalaun/eozin te su takva tkiva slikana digitalnim fotoaparatom koji je spojen sa svjetlosnim

mikroskopom. Također je izmjerena koncentracija proteina u urinu KO miševa u odnosu na WT miševe fluorometrijskom metodom te elektroforetski.

4.3.1. Rezanje tkiva na kriostatu

Uzorci fiksirani 4 %-tnim paraformaldehidom (Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey, SAD; kataloški broj 416780010), krioprotektirani u saharozi (Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey, SAD; kataloški broj 177140010) i smrznuti u pothlađenom izopentanu (Fischer scientific, UK; kataloški broj P/1031/08) čuvani su do rezanja na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga su rezani kriostatom (CM3050S, Leica Biosystems, Njemačka) uz temperature objekta $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ i kriostata $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ na debljinu od $20\text{ }\mu\text{m}$. Narezana tkiva zalijepljena su na predmetna stakalca presvučena želatinom. Na predmetnom stakalcu tkiva su prema dobi poslagana u tri reda (30, 15 i 5 dana). Sveukupno je bilo 40 stakalaca, 20 podrijetlom iz bubrega WT miša, 20 podrijetlom iz bubrega KO miša. Gotova stakalca spremljena su u histološku kutiju i čuvana na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2. Fluorescentna imunohistokemija

Predmetna stakalca s nalijepljenim tkivima rehidrirana su u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta te su nakon toga tkiva obrubljena tekućim repelentom (Liquid blocker super PAP pen, Daido Sangyo Co., Ltd., Tokio, Japan). Stakalca s tkivima podijeljena su u dva dijela radi lakše izvedbe metode. Svaki dio imao je određenu negativnu kontrolu koja je slijedila isti protokol kao i ostala tkiva, osim što na njih nisu stavljena primarna protutijela. Fluorescentna imunohistokemija provedena je prema sljedećem protokolu:

Imunohistokemija protutijelima na gangliozide:

- inkubacija tkiva četiri sata pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vlažnoj komori s otopinom za blokiranje (5 % kozji serum (Thermo Fisher Scientific, SAD; kataloški broj 16210072) i 1 % albumin iz seruma goveda (Capricorn Scientific, Njemačka; kataloški broj BSA-1U) u puferu $1\times\text{ PBS}$ (137 mM NaCl , $2,7\text{ mM KCl}$, $10\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $1,8\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH } 7,4$));

- inkubacija tkiva preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori s primarnim protutijelima na ganglioziđe GM3 (razrjeđenje 1 : 500), GM1 (razrjeđenje 1 : 1000) i GD1a (razrjeđenje 1 : 5000) (Tablica 1.). Predmetna su stakalca s kontrolnim skupinama preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori inkubirana s otopinom za blokiranje;
- ispiranje tkiva tri puta u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- inkubacija tkiva četiri sata pri 4 °C u vlažnoj komori sa sekundarnim protutijelima, točnije protumišjim IgG konjugiranim s fluorescein izotiocijanatom (engl. *fluorescein isothiocyanate*, FITC) (razrjeđenje 1 : 300) (Tablica 2);
- ispiranje tkiva tri puta u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- inkubacija tkiva 10 minuta pri sobnoj temperaturi u vlažnoj komori sa 4',6-diamidino-2-fenilindolom (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; kataloški broj D9542-10MG, razrjeđenje 1 : 1000);
- ispiranje tkiva dva puta u trajanju od 5 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- inkubacija tkiva 10 minuta pri sobnoj temperaturi u vlažnoj komori s bojom Sudan black B (Merck, Burlington, Massachusetts, SAD; kataloški broj 1.15928.0025, 30 %-tna otopina u 90 %-tnom etilen glikolu);
- ispiranje tkiva dva puta u trajanju od 5 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- prekrivanje tkiva Vectashieldom (Vector Labs, Burlingame, California, SAD; kataloški broj H-1000) i pokrovnim stakalcem.

Imunohistokemija protutijelima na biljege splavi i ne-splavi:

- inkubacija tkiva četiri sata pri 4 °C u vlažnoj komori s otopinom za blokiranje;
- inkubacija tkiva preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori s primarnim protutijelima na transferinski receptor (razrjeđenje 1 : 1000) i flotilin-1 (razrjeđenje 1 : 500). Predmetna su stakalca s kontrolnim skupinama preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori inkubirana s otopinom za blokiranje;
- ispiranje tkiva tri puta u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- inkubacija tkiva četiri sata pri 4 °C u vlažnoj komori sa sekundarnim protutijelima, točnije protumišjim IgG konjugiranim s FITC (razrjeđenje 1 : 300);
- ispiranje tkiva tri puta u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- inkubacija tkiva preko tri noći pri 4 °C u vlažnoj komori s primarnim protutijelima na akvaporin-1 i 2 (razrjeđenje 1 : 10). Predmetna su stakalca s kontrolnim skupinama preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori inkubirana s otopinom za blokiranje;
- ispiranje tkiva 3 puta u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;

- inkubacija tkiva četiri sata pri 4 °C u vlažnoj komori sa sekundarnim protutijelima, točnije protužečjim IgG konjugiranim s tetrametilrodaminom (engl. *tetramethylrhodamine*, TRITC) (razrjeđenje 1 : 300);
- inkubacija tkiva 10 minuta pri sobnoj temperaturi u vlažnoj komori s DAPI;
- ispiranje tkiva dva puta u trajanju od 5 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- inkubacija tkiva 10 minuta pri sobnoj temperaturi u vlažnoj komori s bojom Sudan black B;
- ispiranje tkiva dva puta u trajanju od 5 minuta pri sobnoj temperaturi u 1x PBS-u;
- prekrivanje tkiva Vectashieldom i pokrovnim stakalcem.

Predmetna stakalca s tkivima čuvana su u histološkoj kutiji na 4 °C do mikroskopiranja.

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemiji.

| NAZIV PROTUTIJELA | ORGANIZAM IZ KOJEGA PROTUTIJELO POTJEČE | VRSTA PROTUTIJELA | PROIZVOĐAČ I KATALOŠKI BROJ |
|--------------------------------|--|------------------------------|--|
| anti-GM3 | miš | IgM | T.C.I. America, Portland, Oregon, SAD; kataloški broj A2582 |
| anti-GM1 | miš | IgG | Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD |
| anti-GD1a | miš | IgG | |
| anti-Flotilin 1 | miš | IgG | BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD; kataloški broj 610821 |
| anti-Transferinski receptor | miš | IgG | Invitrogen, kataloški broj: 13-6800 |
| anti-Akvaporin 1 | zec | IgG | Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2 HR-10001 Zagreb, Hrvatska |
| anti-Akvaporin 2 | zec | IgG | |

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemiji

| NAZIV PROTUTIJELA | ORGANIZAM IZ KOJEGA PROTUTIJELO POTJEČE | VRSTA PROTUTIJELA | PROIZVOĐAČ I KATALOŠKI BROJ |
|--|--|----------------------|--|
| Protumišje IgG konjugirano s FITC, specifično na fragment F(ab') ₂ | koza | IgG | Jackson Immunoresearch laboratories, SAD, kataloški broj: 115- 095-006 |
| Protuzečje IgG konjugirano s TRITC | koza | IgG | Jackson Immunoresearch laboratories, SAD, kataloški broj: 115- 025-144 |

4.3.3. Mikroskopiranje i kvantifikacija

Tkiva su mikroskopirana uz izvor fluorescentne svjetlosti mikroskopom Axiomot 200M (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) na ukupnom povećanju od 400 ×. Slike tkiva uslikane su digitalnim fotoaparatom Olympus D70 (Olympus, Tokio, Japan) spojenim na mikroskop te su spremljene u tiff formatu. Intenzitet imunopozitivnih reakcija kvantificiran je računalnim programom FIJI (19).

4.3.4. Hemalaun-eozin bojenje tkiva i mikroskopiranje

Hemalaun-eozin bojenje tkiva provedeno je pri sobnoj temperaturi prema sljedećem protokolu:

- ksilen, 10 minuta

- hidracija u seriji etanola – po 5 minuta u otopinama etanola sljedećih udjela, redom kako je navedeno: (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)
- destilirana voda, 5 minuta
- bojenje hemalaunom, 10 minuta
- ispiranje destiliranom vodom, 1 minuta
- razvijanje boje vodovodnom vodom, 10 minuta
- destilirana voda, 1 minuta
- bojenje eozinom, 1 minuta
- ispiranje destiliranom vodom, 5 sekundi
- dehidracija u seriji etanola – jednolično uranjanje stakalaca po 5 puta u otopinama etanola sljedećih udjela, redom kako je navedeno: (70 %, 96 %, 100 %)
- 100 %-tni etanol, 2-3 minute
- uklanjanje etanola ksilenom, 5 minuta

Nakon završenog bojenja na predmetna stakalca stavljen je medij za uklapanje Histological Mounting Medium (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, SAD; kataloški broj HS-103) i stakalca su pokrivena pokrovnica. Preparati su mikroskopirani na svjetlosnom mikroskopu Axiomot 200M (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) i slikani digitalnim fotoaparatom Olympus D70 (Olympus, Tokio, Japan) spojenim na svjetlosni mikroskop, a dobivene slike sačuvane su u tiff formatu.

4.3.5. Mjerenje koncentracije proteina u urinu WT i KO miševa

Koncentracija proteina u urinu miševa izmjerena je fluorometrom Qubit 3 (invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kataloški broj Q33216) prema sljedećem protokolu:

- Pripremiti svježu radnu otopinu (proteinski reagens i pufer u omjeru 1 : 200);
- razdijeliti radne otopine u mikroeprovete (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kataloški broj Q32856) – 190 µl za standarde, 198 µl za uzorke;
- uliti 10 µl standarda te 2 µl uzorka u mikroeprovete;
- inkubacija smjese 15 minuta pri sobnoj temperaturi;
- mjerenje koncentracije na fluorometru.

Također, proteini u urinu vizualizirani su elektroforezom u TGX *stain free* gelu (Bio-Rad, Hercules, California, SAD; kataloški broj 4568123). Pomiješano je 30 μ l svježeg urina miševa starosti mjesec dana s 10 μ l pufera za uzorke (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kataloški broj NP0007). Uzorci su inkubirani s navedenim puferom 5 minuta pri 95 °C. Zatim je 30 μ l tako pripremljenog uzorka naneseo na TGX *stain free gel* uronjen u tris-glicinski pufer (25mM Tris-HCl, 192 mM Gly, 0,1 % SDS, pH = 8,3). Uz uzorke naneseo je i 5 μ l proteinskog standarda SeeBlue Plus2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kataloški broj LC5925). Elektroforeza je provedena pod naponom od 60 V u trajanju od dva sata.

Nakon elektroforeze, gel je aktiviran uređajem Chemi Doc MP (Bio-Rad, Hercules, California, SAD; kataloški broj 17001402) pri čemu su proteini vizualizirani. Dobivena slika analizirana je denzitometrijski u računalnom programu FIJI (19).

4.3.6. Statističke metode

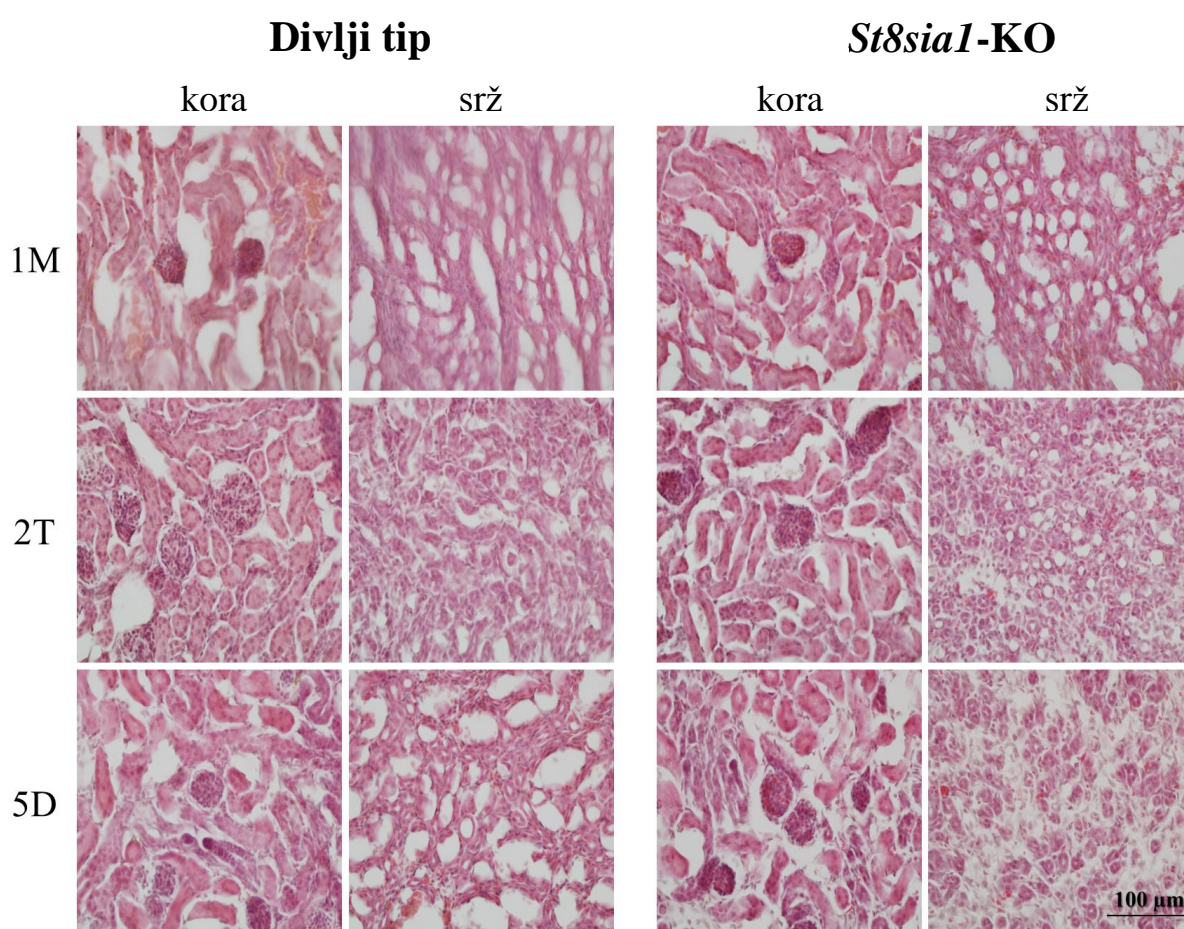
Računalni program Statistica 13 (inačica 12.5, Dell, SAD) korišten je za statističku analizu, a Shapiro-Wilkovim testom testirana je normalnost raspodjele podataka. O raspodjeli dobivenih podataka i modelu uzorka ovisio je daljnji odabir statističke metode. U slučaju normalne raspodjele rezultata korišteni su parametrijski testovi, točnije t-test za testiranje značajnosti razlike između dva uzorka. Odabir vrste t-testa ovisio je o veličini samog uzorka i o tome jesu li uzorci zavisni ili nezavisni. Međutim, ako raspodjela podataka nije bila normalna, koristio se neparametrijski Mann-Whitney-Wilcoxonov test.

Za svaku statističku analizu koristio se uzorak u minimalnom biološkom triplicatu, a razina značajnosti je u svim analizama bila određena s $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Morfologija bubrega KO miševa u odnosu na WT miševe

Klasičnim histološkim bojenjem hemalaun-eozinom prikazana je morfologija bubrega miševa divljega tipa (WT) u odnosu na miševe s isključenim (KO) *St8sial1* genom. Miševi su u starosti od 30, 15 i 5 dana.

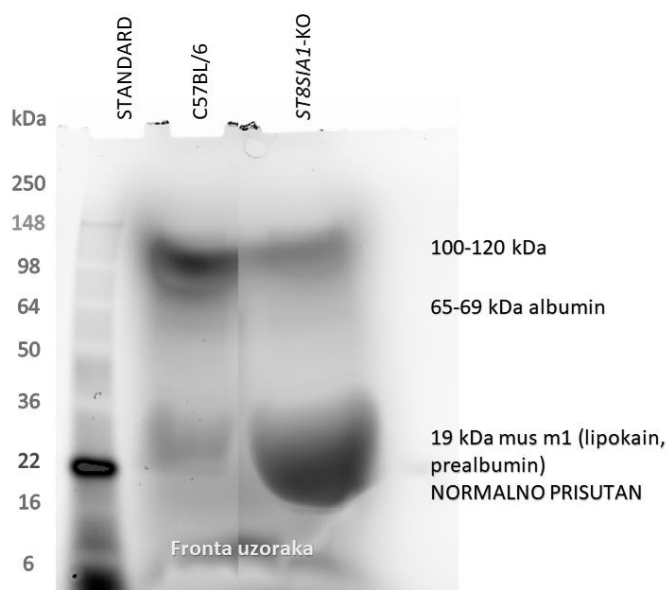


Slika 3. Morfologija bubrega WT i KO miševa prikazana hemalaun-eozin bojenjem. Povećanje 400 ×, skala 100 μm. **Legenda:** 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, WT – divlji tip, *St8sial1*-KO – miš s isključenim *St8sial1* genom. Izradio autor.

Analizom morfologije bubrega WT i KO miševa bojanih hemalaun-eozinom utvrđeno je da nema značajnih razlika.

5.2. Analiza koncentracije proteina u urinu

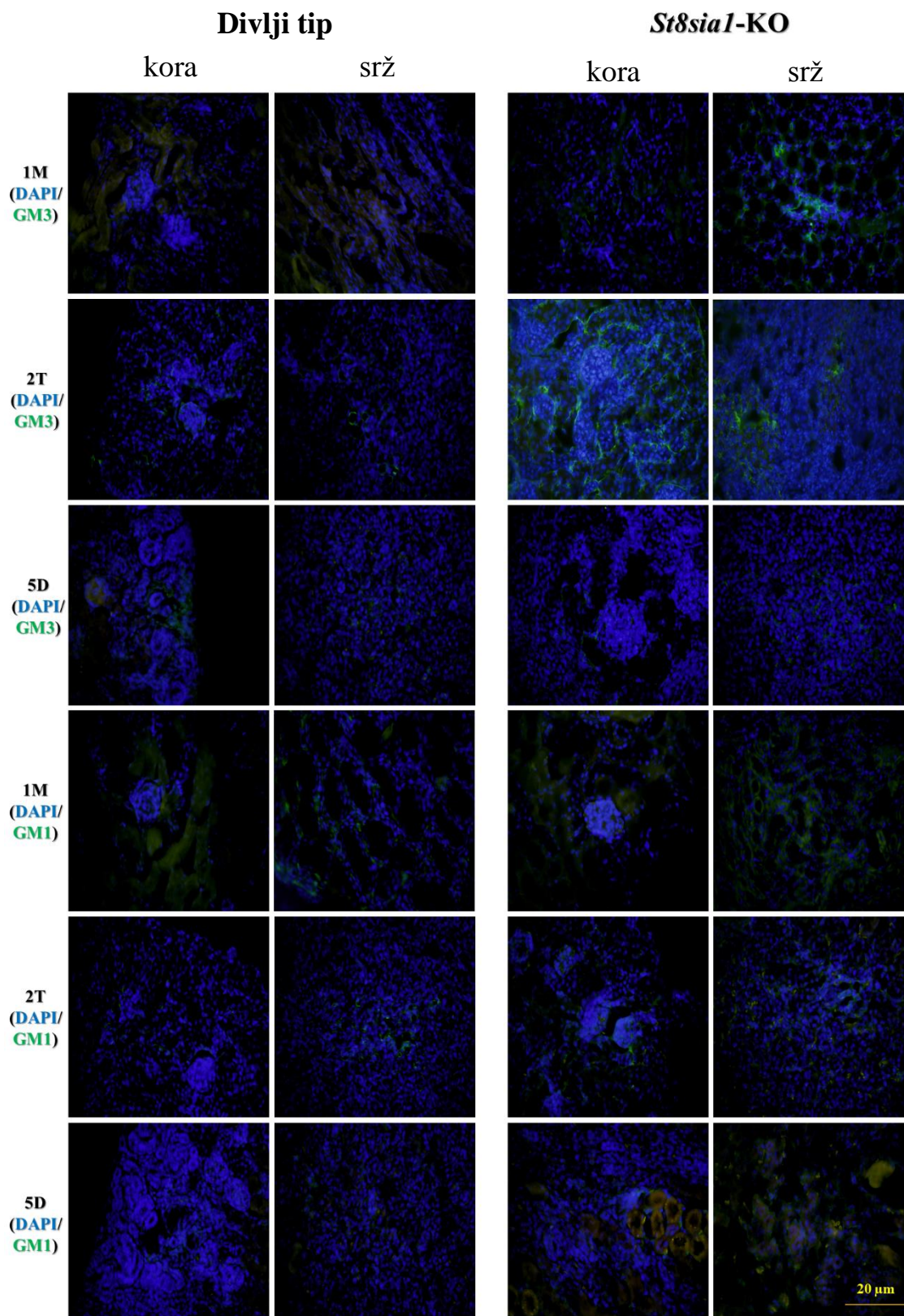
Analiza sadržaja proteina u urinu miševa pokazala je da i WT i KO miševi starosti 1 mjesec imaju prisutne proteine u urinu. *St8sia1*-KO miševi su imali 1,9 mg/ml, a WT 2,01 mg/ml proteina. Natrij dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezom (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) s TGX *stain free* tehnologijom utvrđeno je da KO imaju 2,6 puta veći sadržaj 100 kilodaltonskog proteina, 2,2 puta veći udio albumina te otprilike 3 puta veći udio lipokaina.



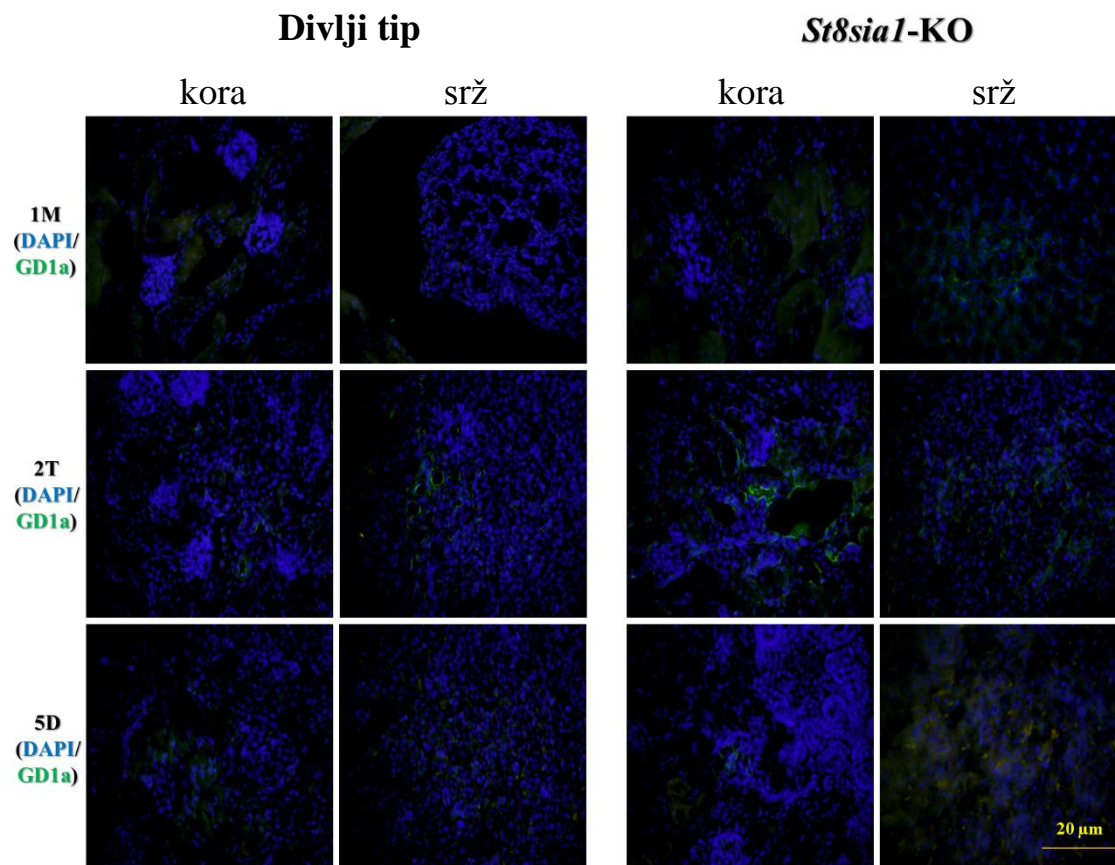
Slika 4. Vizualizacija proteina u urinu miševa. **Legenda:** kDa – kilodalton, C57BL/6 – divlji tip miša, *St8sia1*-KO – miš s isključenim genom *St8sia1*. Izradio autor.

5.3. Analiza raspodjele gangliozida u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe

Analizirana je raspodjela GSL-a u kori i srži bubrega WT i KO miševa u starosti od 5, 15 i 30 dana. Shapiro-Wilkovim testom ispitana je distribucija dobivenih podataka te je utvrđeno da raspodjela GSL-a u bubregu nije slijedila normalnu distribuciju te su se Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom odredile razlike između varijabli.



Slika 5. Raspodjela GM3 i GM1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Povećanje 400 ×, skala 20 μm. **Legenda:** 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, *St8sia1*-KO – miš s isključenim *St8sia1* genom, zelena boja – tkivo obilježeno fluorescein izotiocijanatom (FITC), plava boja – tkivo obilježeno nuklearnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Izradio autor.

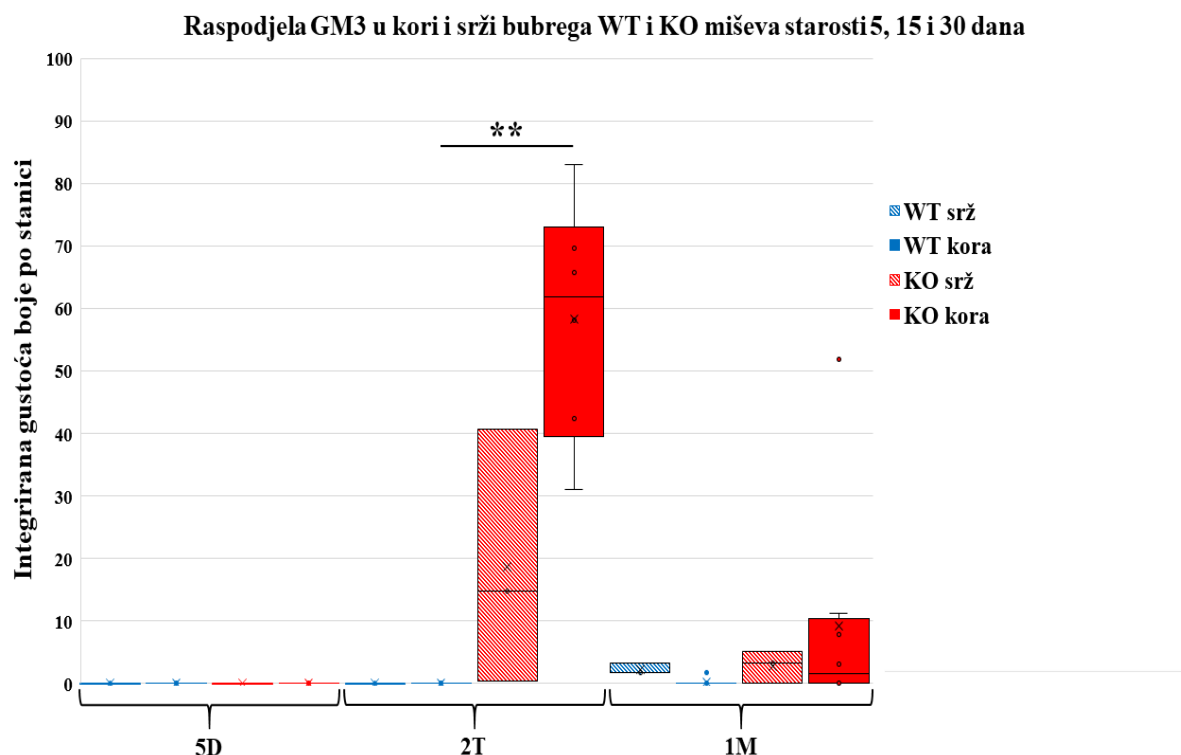


Slika 6. Raspodjela GD1a u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Povećanje 400 ×, skala 20 μm. **Legenda:** 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, *St8sia1*-KO – miš s isključenim *St8sia1* genom, zelena boja – tkivo obilježeno fluorescein izotiocijanatom (FITC), plava boja – tkivo obilježeno nuklearnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Izradio autor.

5.3.1. Analiza raspodjele GM3

Razlike u raspodjeli GM3 u srži bubrega nisu bile statistički značajne između WT i KO miševa.

Međutim, razlike u raspodjeli GM3 u kori bubrega bile su statistički značajne između WT i KO miševa, i to u starosti od 2 tjedna. GM3 je puno više zastupljen u KO mišu čiji medijan iznosi 61,92, a u WT mišu 0. U kori između WT i KO miševa starosti 1 mjesec i 5 dana razlika u raspodjeli GM3 nije bila statistički značajna.

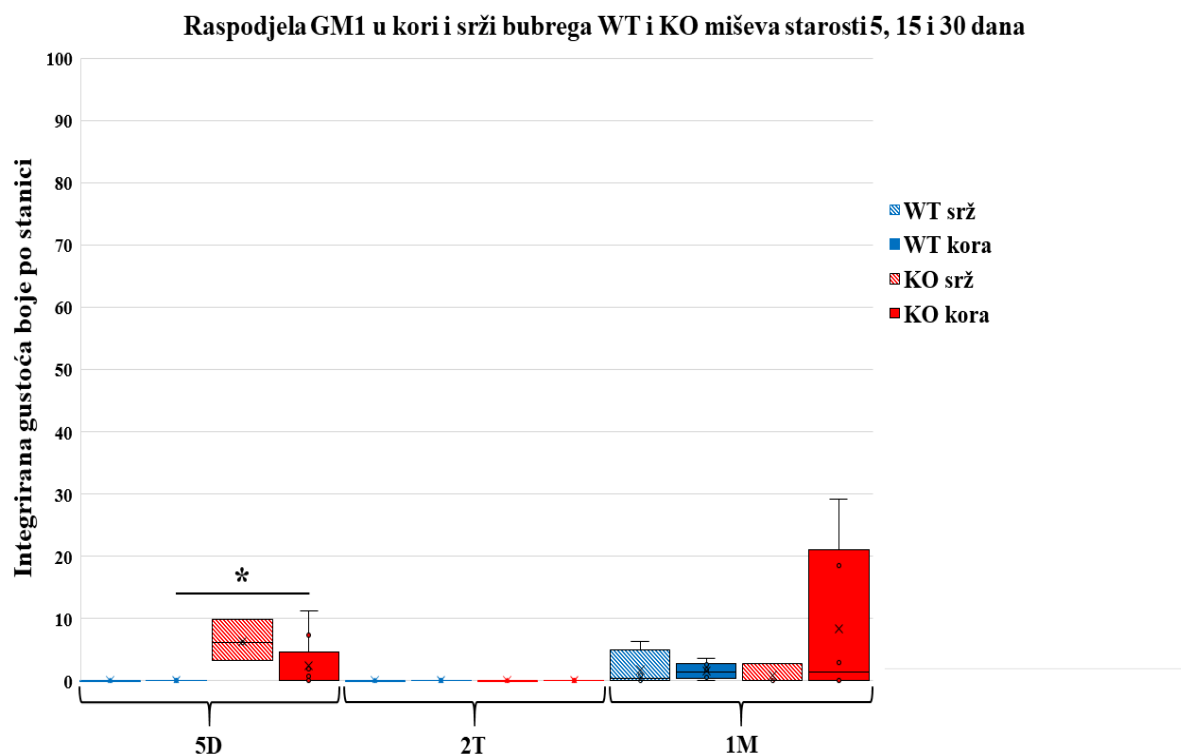


Slika 7. Grafički prikaz raspodjele GM3 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sial* genom, crna crta iznad brka – pokazatelj koje se grupe značajno razlikuju, ** – $0,01 > p > 0,001$. Izradio autor.

5.3.2. Analiza raspodjele GM1

Razlike u raspodjeli GM1 u srži bubrega nisu bile statistički značajne između WT i KO miševa.

Međutim, razlike u raspodjeli GM1 u kori bubrega bile su statistički značajne između WT i KO miševa, i to u starosti od 5 dana. GM1 je više zastupljen u KO mišu čiji medijan iznosi 0,11, a u WT mišu 0. U kori između WT i KO miševa starosti 1 mjesec i 2 tjedna razlika u raspodjeli GM1 nije bila statistički značajna.

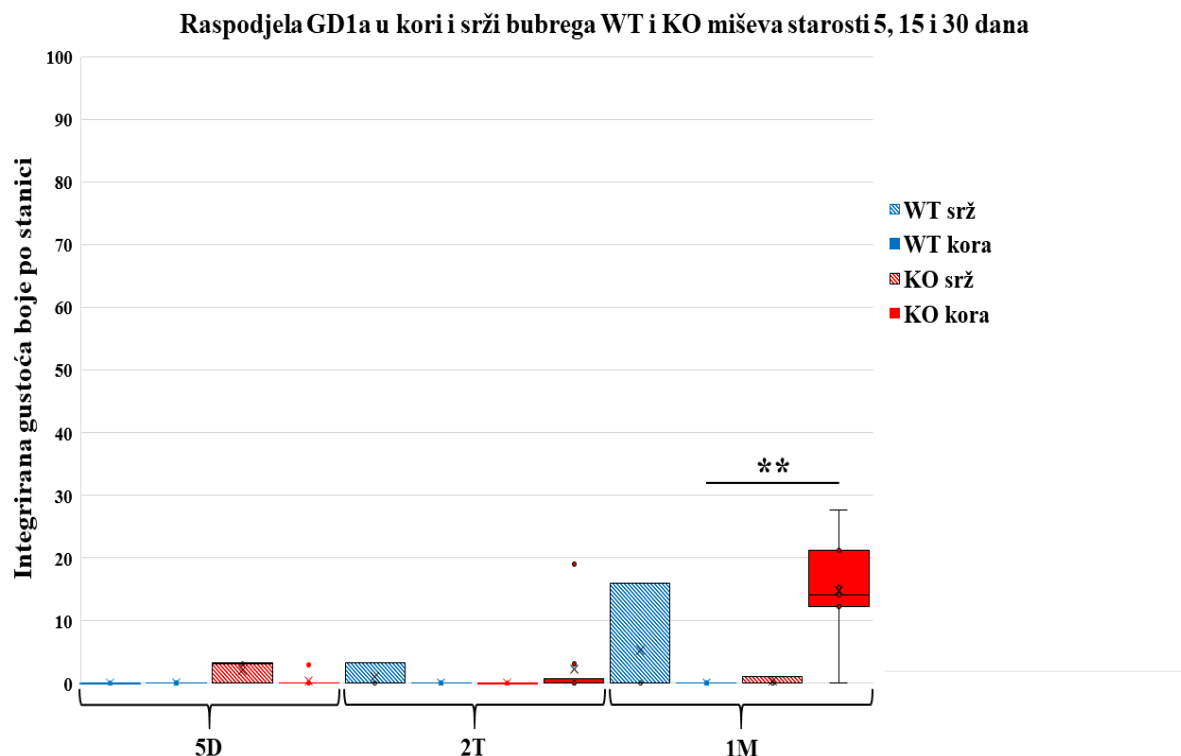


Slika 8. Grafički prikaz raspodjele GM1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sia1* genom, crna crta iznad brka – pokazatelj koje se grupe značajno razlikuju, * – $0,05 > p > 0,01$. Izradio autor.

5.3.3. Analiza raspodjele GD1a

Razlike u raspodjeli GD1a u srži bubrega nisu bile statistički značajne između WT i KO miševa.

Međutim, razlike u raspodjeli GD1a u kori bubrega bile su statistički značajne između WT i KO miševa, i to u starosti od 1 mjesec. GD1a je više zastupljen u KO mišu čiji medijan iznosi 14,08, a u WT mišu 0. U kori između WT i KO miševa starosti 2 tjedna i 5 dana razlika u raspodjeli GD1a nije bila statistički značajna.

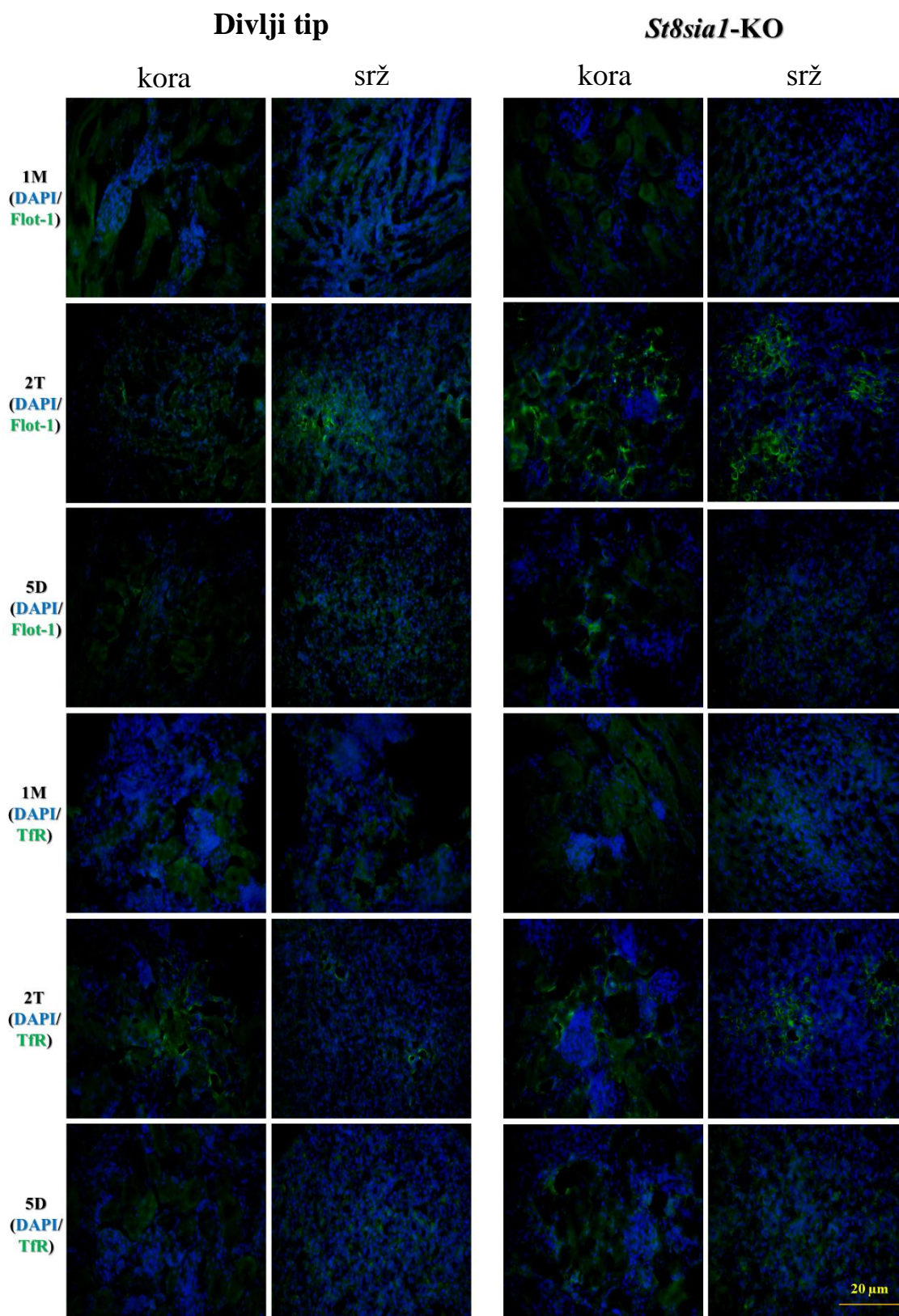


Slika 9. Grafički prikaz raspodjele GD1a u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sial* genom, crna crta iznad brka – pokazatelj koje se grupe značajno razlikuju, ** – $0,01 > p > 0,001$. Izradio autor.

Zaključno, GM3 je bio najzastupljeniji u bubrezima KO miševa te ga po zastupljenosti dalje slijede GD1a i GM1.

5.4. Analiza raspodjele flotilina-1 i transferinskog receptora u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe

Analizirana je raspodjela flotilina-1 i transferinskog receptora u kori i srži bubrega WT i KO miševa u starosti od 5, 15 i 30 dana. Shapiro-Wilkovim testom ispitana je distribucija dobivenih podataka te je utvrđeno da raspodjela flotilina-1 i transferinskog receptora u bubregu nije slijedila normalnu distribuciju te su se Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom odredile razlike između varijabli.

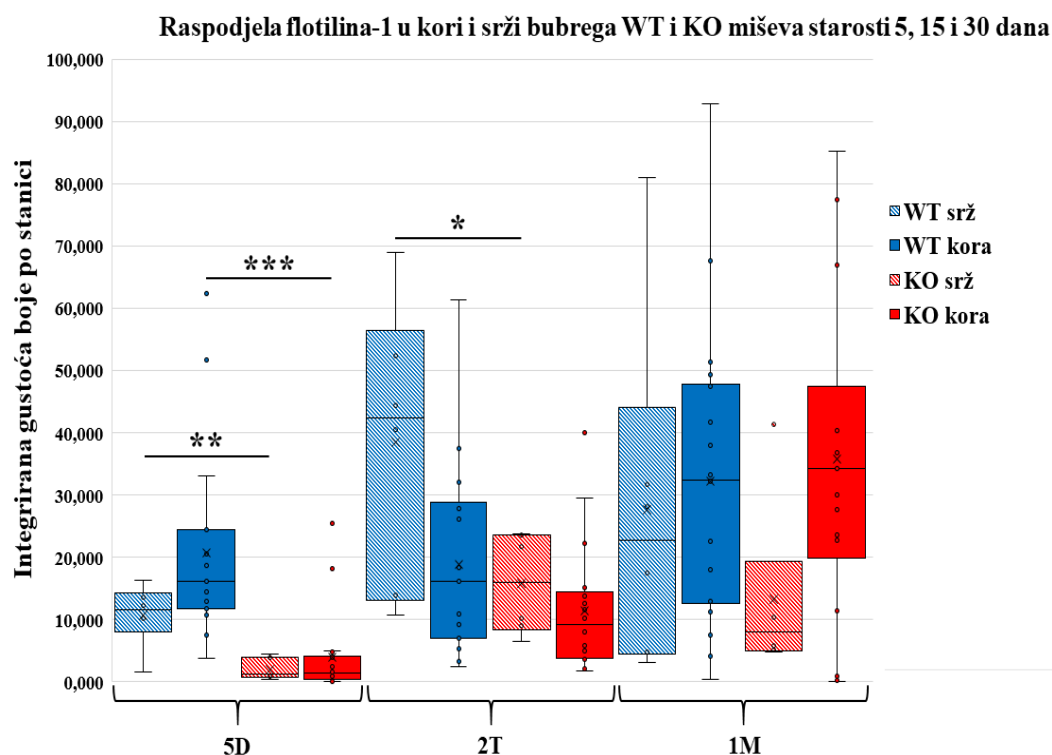


Slika 10. Raspodjela flotilina-1 i transferinskog receptora u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Povećanje 400 ×, skala 20 µm. **Legenda:** 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, *St8sia1*-KO – miš s isključenim *St8sia1* genom, zelena boja – tkivo obilježeno fluorescein izotiocijanatom (FITC), plava boja – tkivo obilježeno nuklearnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Izradio autor.

5.4.1. Analiza raspodjele flotilina-1

Razlike u raspodjeli flotilina-1 u srži bubrega bile su statistički značajne između WT i KO miševa, i to u starosti od 5 dana i 2 tjedna. U oba slučaja, flotilin-1 bio je više zastupljen u WT mišu. U WT mišu starosti od 5 dana medijan je iznosio 11,57, a u KO mišu 1,23. U WT mišu starosti 2 tjedna medijan je iznosio 42,48, a u KO mišu 16. U srži između WT i KO miševa starosti 1 mjesec razlika u raspodjeli flotilina-1 nije bila statistički značajna.

Razlike u raspodjeli flotilina-1 u kori bubrega bile su statistički značajne između WT i KO miševa, i to u starosti od 5 dana. Flotilin-1 bio je više zastupljen u WT mišu i njegov medijan je iznosio 16,23, a u KO mišu 1,51. U kori između WT i KO miševa starosti 1 mjesec i 2 tjedna razlika u raspodjeli flotilina-1 nije bila statistički značajna.

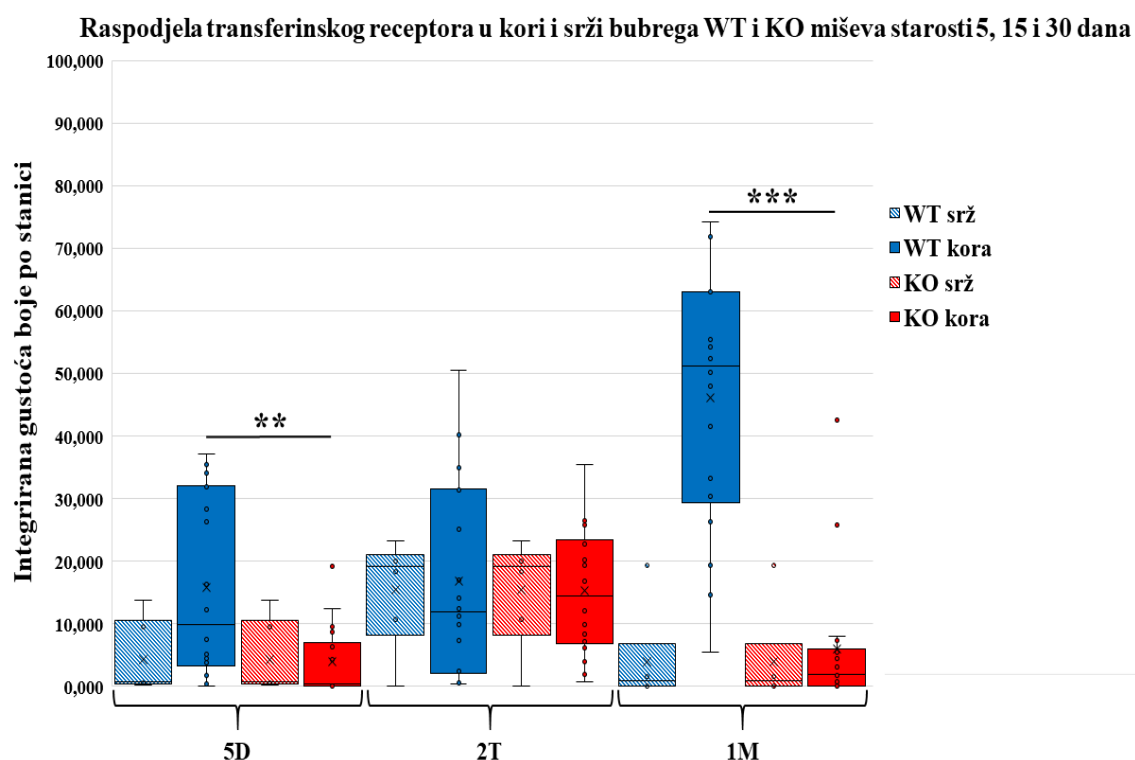


Slika 11. Grafički prikaz raspodjele flotilina-1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sial* genom, crna crta iznad brka – pokazatelj koje se grupe značajno razlikuju, * – $0,05 > p > 0,01$, ** – $0,01 > p > 0,001$, *** – $0,001 > p$. Izradio autor.

5.4.2. Analiza raspodjele transferinskog receptora

Razlike u raspodjeli transferinskog receptora u srži bubrega nisu bile statistički značajne između WT i KO miševa.

Međutim, razlike u raspodjeli transferinskog receptora u kori bubrega bile su statistički značajne, i to u starosti 5 dana i 1 mjesec. U oba slučaja, transferinski receptor bio je više zastupljen u WT mišu. U WT mišu starosti 5 dana medijan je iznosio 9,92, a u KO mišu 0,5. U WT mišu starosti 1 mjesec medijan je iznosio 51,21, a u KO mišu 1,97. U kori između WT i KO miševa starosti 2 tjedna razlika u raspodjeli transferinskog receptora nije bila statistički značajna.



Slika 12. Grafički prikaz raspodjele transferinskog receptora u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sial* genom, crna crta iznad brka – pokazatelj koje se grupe značajno razlikuju, ** – $0,01 > p > 0,001$, *** – $0,001 > p$. Izradio autor.

5.4.3. Usporedba raspodjele flotilina-1 i transferinskog receptora prema raspodjeli gangliozida između WT i KO miševa

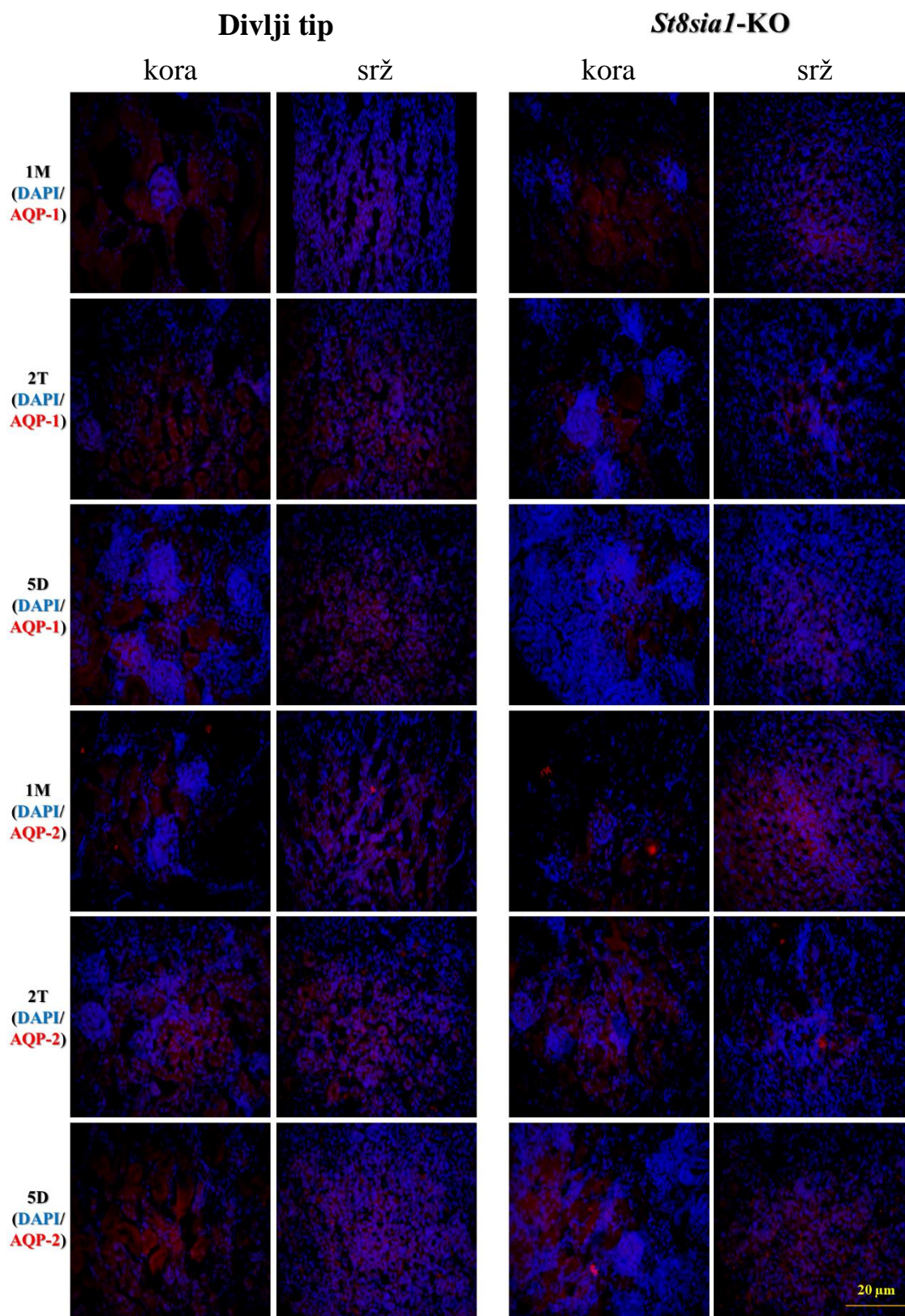
Gledajući razlike u raspodjeli GSL-a u kori i srži bubrega koje su bile statistički značajne između WT i KO miševa vidi se da su isti više zastupljeni u kori bubrega KO miševa.

S druge strane, gledajući razlike u raspodjeli flotilina-1 i transferinskog receptora u kori i srži bubrega koje su bile statistički značajne između WT i KO miševa vidi se da je flotilin-1 bio više zastupljen u srži i kori WT miševa, a transferinski receptor u kori WT miševa.

Zaključno, GSL-ovi su bili više zastupljeni u KO miševima, dok su flotilin-1 i transferinski receptor više zastupljeni u WT miševima.

5.5. Analiza raspodjele akvaporina-1 i 2 u bubregu KO miševa u odnosu na WT miševe

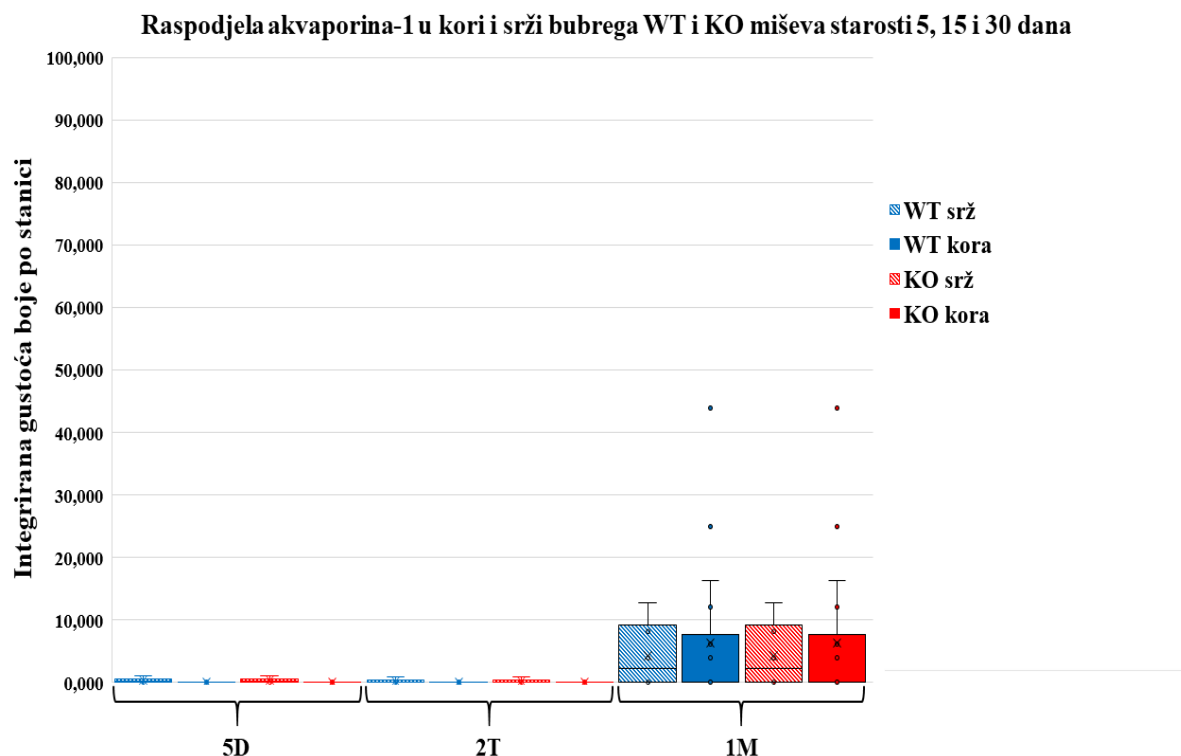
Analizirana je raspodjela akvaporina-1 i 2 u kori i srži bubrega WT i KO miševa u starosti od 5, 15 i 30 dana. Shapiro-Wilkovim testom ispitana je distribucija dobivenih podataka te je utvrđeno da raspodjela akvaporina-1 i 2 u bubregu nije slijedila normalnu distribuciju te su se Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom odredile razlike između varijabli.



Slika 13. Raspodjela akvaporina-1 i 2 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Povećanje 400 ×, skala 20 µm. **Legenda:** 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, *St8sia1*-KO – miš s isključenim *St8sia1* genom, crvena boja – tkivo obilježeno tetrametilrodaminom (TRITC), plava boja – tkivo obilježeno nuklearnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindolom. Izradio autor.

5.5.1. Analiza raspodjele akvaporina-1

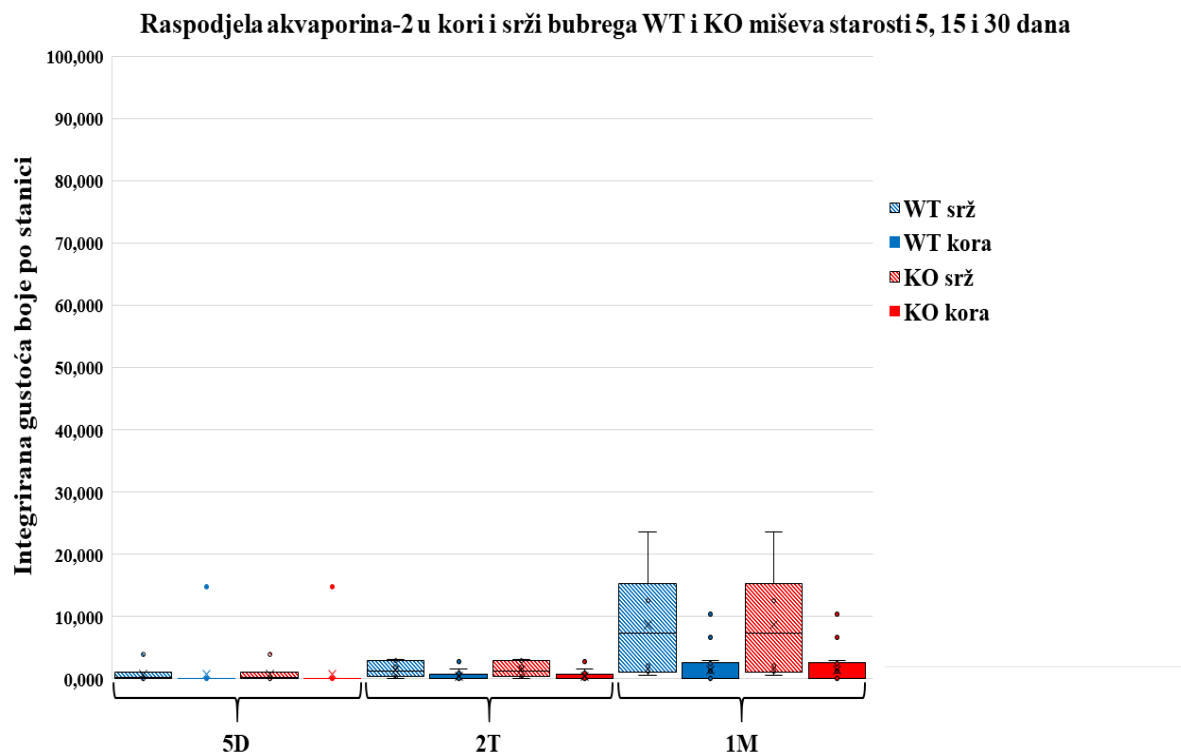
Razlike u raspodjeli akvaporina-1 u srži i kori bubrega nisu bile statistički značajne između WT i KO miševa.



Slika 14. Grafički prikaz raspodjele akvaporina-1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sia1* genom. Izradio autor.

5.5.2. Analiza raspodjele akvaporina-2

Razlike u raspodjeli akvaporina-2 u srži i kori bubrega nisu bile statistički značajne između WT i KO miševa.



Slika 15. Grafički prikaz raspodjele akvaporina-2 u kori i srži bubrega WT i KO miševa. Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, WT – divlji tip, KO – miš s isključenim *St8sial1* genom. Izradio autor.

Zaključno, akvaporini-1 i 2 bili su podjednako raspodijeljeni u kori i srži bubrega WT i KO miševa svih godišta te razlika u njihovoj raspodjeli nije bila statistički značajna.

6. RASPRAVA

6.1. Morfologija bubrega WT i KO miševa

Analizirana je morfologija bubrega WT i *St8sia1*-KO miševa hemalaun-eozin bojenjem. Analiza je pokazala da značajne razlike u morfologiji bubrega između dvije genotipski različite skupine miševa nema. Kako se radi o mladim miševima, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da ovi miševi starenjem neće razviti bubrežni fenotip s obzirom na molekularne promjene koje su uočene ovim istraživanjem.

Istraživanje provedeno nad *Gal3st1*-KO i *Ugcg*-KO miševima, koji su KO za gene enzima uključene uzvodno od GD3 sintaze u sintezi gangliozida, pokazalo je slične rezultate (20), ali kod tih miševa nije uočena proteinurija.

St8sia1 gen kodira enzim gangliozid GD3 sintazu koji je odgovoran za sintezu gangliozida GD3 i GT3 te time i svih gangliozida b i c serije (Slika 2.) (15), ali ovi miševi imaju gangliozide a serije i to u tolikoj količini da nadoknađuju nedostatak struktura iz b i c serije.

S druge strane, *Ugcg* gen kodira enzim GlcCer sintazu koji je odgovoran za sintezu GlcCer koji je ključan za sintezu svih GSL-a a, b i c serije (21). Ovi miševi kompenzatorno sintetiziraju gangliozide koji umjesto glukozom započinju galaktozom, također u količinama koje potpuno kompenziraju nedostatak „ganglio“ serije GSL-a.

U istraživanju provedenom nad *Ugcg*-KO i *Gal3st1*-KO miševima metodom floksinga dobiveni su tkivno specifični KO miševi koji su pokazali normalnu morfologiju bubrega (20). Za pretpostaviti je da oba navedena KO miša imaju bolju kompenzaciju od *St8sia1* modela kojega smo mi proučavali.

6.2. Koncentracija proteina u urinu WT i KO miševa

Analizom sadržaja urina WT i KO miševa došlo se do zaključka da i WT i KO miševi imaju proteine u urinu pri čemu je udio albumina 2,2 puta veći u urinu KO miša.

Istraživanja su pokazala da je neuravnoteženost u sintezi GSL-a, koje je karakteristično za ispitivani životinjski model, povezana s patološkim stanjima kao što su tip 1 i 2 diabetesa mellitusa koji pogoršanjem može dovesti do dijabetičke nefropatije i smanjene brzine glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR) (9). Jedan od prvih znakova dijabetičke nefropatije prisustvo je albumina u urinu (22). Na temelju provedenog istraživanja nad C57BL/6 miševima (miševi divljeg tipa), koji su korišteni i u našem istraživanju, pokazano je da se nakon streptozotocin (engl. *streptozotocin*, STZ) izazvanog dijabetesa simptomi dijabetičke nefropatije pojavljuju tek nakon 6 mjeseci. Također, Konzorcijum životinjskih modela s dijabetičkim komplikacijama (engl. *Animal models of diabetic complications consortium*, AMDCC) izdao je kriterije koji potvrđuju prisustvo dijabetičke nefropatije u glodavcima. Kriteriji su utemeljeni na patološkim i kliničkim osobinama dijabetičke nefropatije u ljudi i iznose tvrdnju da je za dijagnostiku dijabetičke nefropatije potrebna 10 puta veća albuminurija u KO miševa nego što je to u WT miševima (23). Iz ovih saznanja, koncentracija albumina u urinu KO miševa korištenih u našem istraživanju nije dovoljna da bi se mogla dijagnosticirati dijabetička nefropatija. Jedan od mogućih razloga za to činjenica je da su KO miševi bili stari 1 mjesec te se svi simptomi dijabetičke nefropatije nisu uspjeli razviti. Jedan od kriterija koji bi dodatno pomogli pri dijagnosticiranju dijabetičke nefropatije je GFR.

Imunohistokemijska analiza pokazala je povećane koncentracije GM3 u bubregu KO miša. Pretpostavka u provedenim istraživanjima bila je da GM3 ima važnu ulogu u održavanju naboj selektivne filtracijske membrane glomerula. Poremećena raspodjela GM3, koja je prisutna u *St8sia1*-KO mišu, može dovesti do gubitka funkcije naboj selektivne filtracijske membrane glomerula te pri tome dovesti do povećane koncentracije proteina u urinu (9).

6.3. Raspodjela gangliozida u bubrezima WT i KO miševa

Korištenjem protutijela na GM3, GM1 i GD1a u imunohistokemijskoj analizi došlo se do zaključka da su ispitivani gangliozidi više zastupljeni u KO u odnosu na WT miševe.

U istraživanju provedenom nad miševima kojima je uklonjen *St8sia1* gen pokazano je da zbog manjka kompleksnih GSL skupina b i c serije takvi miševi sintetiziraju samo GSL a serije kojima je prekursor GM3 te su oni prisutni u većim količinama (20, 24). U tu skupinu GSL-a također pripadaju GM1 i GD1a. Ovo saznanje podudara se s dobivenim rezultatima i

literaturom. Naime, *St8sial* gen kodira enzim gangliozid GD3 sintazu koji je odgovoran za sintezu gangliozida GD3 i GT3 te time i svih gangliozida b i c serija. U životinjskom modelu korištenom u našem istraživanju taj gen nedostaje te stoga i gangliozidi b i c serija nedostaju te dolazi do nakupljanja gangliozida a serije (9).

Nadalje, kvantifikacijom intenziteta imunopozitivnih reakcija dobiveno je da su isti gangliozidi zastupljeni pretežito u kori bubrega, dok u srži razlika u raspodjeli nije bila statistički značajna. Od svih gangliozida, GM3 je bio najviše zastupljen nakon kojega po redu slijede GD1a i GM1.

Istraživanje provedeno nad bubrezima štakora pokazalo je da su GM3 i GD3 najzastupljeniji u bubrežnom tkivu. Pokazano je da je u manjoj mjeri prisutan i GD1a te da su koncentracije GM1 nakon 3. postnatalnog dana bile jedva mjerljive, što se podudara s rezultatima našeg istraživanja. Rezultati istraživanja provedenog na bubrezima štakora također pokazuju da je GM3 jednoliko raspoređen u srži i kori bubrega, dok je naše istraživanje pokazalo da je isti dominantan u kori, a u srži razlika u raspodjeli između WT i KO miševa nije bila statistički značajna (17, 25).

U našem istraživanju također je uočeno kako *St8sial*-KO u različitim razvojnim fazama bubrega koristi drugi gangliozid kao kompenzaciju vjerojatno kompleksnijih formi koje nedostaju. Tako životinje stare 5 dana pretjerano eksprimiraju GM1, životinje stare 2 tjedna GM3, a životinje stare 1 mjesec GD1a.

6.4. Raspodjela flotilina-1 i transferinskog receptora u bubrezima WT i KO miševa

Korištenjem protutijela na flotilin-1 i transferinski receptor u imunohistokemijskoj analizi došlo se do zaključka da su isti više zastupljeni u WT nego u KO miševima, osobito 5. dana razvoja. S obzirom da je flotilin-1 marker lipidnih splavi, zaključujemo kako kod *St8sial*-KO miševa dolazi do značajnog poremećaja sastava lipidnih splavi.

Istraživanja su pokazala da je transferinski receptor jednoliko raspoređen u kori i srži bubrega WT miševa (26) pa se može pretpostaviti da je sastav ne-splavi manje promijenjen od sastava splavi.

6.5. Raspodjela akvaporina-1 i 2 u bubrezima WT i KO miševa

Korištenjem protutijela na akvaporin-1 i 2 u imunohistokemijskoj analizi došlo se do zaključka da su akvaporini jednoliko raspodijeljeni u meduli i srži bubrega WT i KO miševa.

Istraživanja su pokazala da su akvaporini-1 i 2 podjednako prisutni u korteksu i srži bubrega sisavaca. Imunokemijskom analizom pokazano je da je akvaporin-1 prisutan od proksimalnog zavijenog tubula u kori do silaznog tankog kraka Henleove petlje i same Henleove petlje u srži bubrega, a akvaporin-2 je raspodijeljen od spojnog tubula u kori do sabirnih kanalića u srži bubrega (27).

Oba su kanala važna za filtraciju molekula vode pa se može zaključiti kako je filtracijska sposobnost bubrega kod *St8sia1*-KO miševa održana.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Između bubrega WT i KO miševa nema morfološki značajnih razlika.
- WT i KO miševi su imali prisutne proteine u urinu te postoji mogućnost daljnjeg razvoja nefropatije.
- GM3, GM1 i GD1a bili su više zastupljeni u KO nego u WT miševima što se tumači kompenzacijom za forme gangliozida koje nedostaju.
- Transferinski receptor i flotilin-1 bili su više zastupljeni u WT nego u KO miševima pa postoji mogućnost značajnog poremećaja sastava lipidnih splavi.
- Akvaporini-1 i 2 podjednako su raspodijeljeni u kori i srži bubrega WT i KO miševa što objašnjava održanu bubrežnu filtraciju kod oba miša.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Hemalaun-eozin bojenjem prikazati morfologiju bubrega *St8sia1*-KO i WT miševa starosti 5, 15 i 30 dana, izmjeriti koncentraciju proteina u urinu KO i WT miševa starosti 1 mjesec, prikazati raspodjelu GM3, GM1 i GD1a gangliozida protutijelima na gangliozide u kori i srži bubrega KO i WT miševa starosti 5, 15 i 30 dana, protutijelima na flotilin-1 i transferinski receptor prikazati raspodjelu markera lipidnih splavi i ne-splavi prema raspodjeli gangliozida u bubrezima KO i WT miševa starosti 5, 15 i 30 dana i protutijelima na akvaporine, flotilin-1 i transferinski receptor odrediti položaj akvaporina u bubrezima KO i WT miševa starosti 5,15 i 30 dana.

Nacrt studije: Studija parova – životinje divljeg tipa prema životinjama s isključenim genom *St8sia1*.

Materijal i metode: U istraživanju je korišteno tkivo bubrega WT miševa i KO miševa s isključenim genom *St8sia1* te obje skupine obuhvaćaju životinje starosti 5, 15 i 30 dana.

Rezultati: Hemalaun-eozin bojenje nije prikazalo značanju razliku u morfologiji bubrega između WT i KO miševa, analiza urina pokazala je da WT i KO miševi imaju prisutne proteine u urinu, imunohistokemijska analiza pokazala je da su gangliozidi više zastupljeni u bubrezima KO, a flotilin-1 i transferinski receptor u bubrezima WT miševa te je istom metodom dobiveno da su akvaporini-1 i 2 podjednako rasprostranjeni u kori i srži bubrega KO i WT miševa.

Zaključak: U bubrezima KO miševa došlo je do poremećaja raspodjele gangliozida, flotilina-1 i transferinskog receptora, dok je raspodjela akvaporina-1 i 2 ostala nepromijenjena.

Ključne riječi: Gangliozid; hemalaun-eozin; imunohistokemijska analiza; lipidne splavi; *St8sia1* gen.

9. SUMMARY

The Kidney Phenotype of *St8sia1* Knockout Mouse

Objectives: To show the morphology of the kidneys originating from *St8sia1*-KO and WT mice aging from 5, 15 and 30 days using the haematoxylin-eosin staining. To measure the concentration of protein in urine from KO and WT one-month-old mice. To show distribution of GM3, GM1 and GD1a gangliosides in cortex and medulla of kidneys originating from KO and WT mice aging from 5, 15 and 30 days using ganglioside antibodies. To show distribution of flotillin-1 and transferrin receptor in cortex and medulla of kidneys originating from KO and WT mice aging from 5, 15 and 30 days using flotillin-1 and transferrin receptor antibodies. To compare the distribution of flotillin-1 and transferrin receptor to distribution of GM3, GM1 and GD1a gangliosides. To determine the position of aquaporins-1 and 2 in kidneys originating from KO and WT mice aging from 5, 15 and 30 days using aquaporin-1, aquaporin-2, flotillin-1 and transferrin receptor antibodies.

Study design: Matched pair study – WT animals against animals with excluded *St8sia1* gene.

Material and Methods: The study includes kidney tissue originating from WT and KO mice with excluded *St8sia1* gene aging from 5, 15 and 30 days.

Results: Haematoxylin-eosin staining did not present any morphological differences in WT and KO kidneys. Urine analysis showed that both WT and KO mice had protein in their urine samples. Immunohistochemical analysis showed that gangliosides were more present in kidneys originating from KO mice. Same analysis showed that flotillin-1 and transferrin receptor were more present in kidneys originating from WT mice and that aquaporins-1 and 2 were equally disseminated in the cortex and medulla of kidneys originating from KO and WT mice.

Conclusion: A disorder in distribution of gangliosides, flotillin-1 and transferrin receptor occurred in kidneys originating from KO mice, while at the same time aquaporin-1 and 2 distribution in kidneys stayed the same.

Keywords: Ganglioside; haematoxylin-eosin; immunohistochemical analysis; lipid rafts; *St8sia1* gene.

10. LITERATURA

1. Cooper MG, Hausman RE. Stanica – Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada 10000 Zagreb; 2010.
2. Young B, Heath JW. Wheather's Functional Histology – a text and colour atlas. 4. izd. Edinburg, London, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livigstone; 2000.
3. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 2. izd. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders, An imprint of Elsevier; 2001.
4. Danielsen ME, Hansen HG. Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells (Review). *Mol Membr Biol.* 2006;23(1):71-79.
5. Hooper MN. Foreword: lipid rafts/biophysics, cell signaling, trafficking and processing. *Mol Membr Biol.* 2006;23(1):1-3.
6. Richardson DD, Borja MF. Leukocyte adhesion and polarization: Role of glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored proteins. *Bioarchitecture.* 2015;5(5-6):61-69.
7. Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 1999;18(3):501-511.
8. Schnaar RL, Kinoshita T. Essentials of Glycobiology. 3. izd. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.
9. Novak A, Mužinić Režić N, Čulić Čikeš V, Božić J, Kurir Tičinović T, Ferhatović L, i sur. Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of types 1 and 2 diabetes. *J Physiol Biochem.* 2013;69(4):727-35.
10. Gil-Tommee C, Vidal-Martinez G, Annette Reyes C, Vargas- Medrano J, Herrera GV, Martin SM, i sur. Parkinsonian GM2 synthase knockout mice lacking mature gangliosides develop urinary dysfunction and neurogenic bladder. *Exp Neurol.* 2019;311:265-273.
11. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. *FEBS J.* 2013;280(24):6338-53.

12. Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J.* 2012;441(3):789-802.
13. Pardo Di A, Basit A, Armirotti A, Amico E, Castaldo S, Pepe G, i sur. *De novo* synthesis of sphingolipids is defective in experimental models of Huntington's disease. *Front Neurosci.* 2017;11:698.
14. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life.* 2010;62(5):347-356.
15. GeneCards. Human gene database. *St8sial* Gene. Dostupno na adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ST8SIA1>. Datum pristupa: 23.08.2019.
16. UniProt. UniProtKB - Q92185 (SIA8A_HUMAN). Dostupno na adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q92185>. Datum pristupa: 23.08.2019.
17. Vukovic I, Bozic J, Markotic A, Ljubicic S, Ticinovic Kurir T. The missing link – Likely pathogenetic role of GM3 and other gangliosides in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40:306-314.
18. Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J Neuroinflammation.* 2014;11:61.
19. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods.* 9(7):676-682.
20. Allende ML, Proia RL. Simplifying complexity: genetically resculpting glycosphingolipid synthesis pathways in mice to reveal function. *Glycoconj J.* 2014;31(9):613-622.
21. Wegner MS, Gruber L, Mattjus P, Geisslinger G, Grösch S. The UDP-glucose ceramide glycosyltransferase (UGCG) and the link to multidrug resistance protein 1 (MDR1). *BMC Cancer.* 2018;18(1):153.
22. Azushima K, Gurley SB, Coffman TM. Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nat Rev Nephrol.* 2017;14(1):48-56.
23. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016;9:279-290.

24. Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, Okada M, Okumura K, Hayakawa T, i sur. Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29881-29888.
25. Saito M, Sugiyama K. Gangliosides in rat kidney: composition, distribution, and developmental changes. *Arch Biochem Biophys.* 2001;386(1):11-6.
26. Zhang D, Holtz EM, Rouault TA. Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(2):401-6.
27. Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. *Anat Sci Int.* 2017;92:187-199.

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

- Ime i prezime: Karlo Živatović
- Datum i mjesto rođenja: 10. listopad 1997., Slavonski Brod
- Adresa stanovanja: Dinka Šimunovića 20, 35000 Slavonski Brod
- Kontakt: 095/519 3817
- E-pošta: karlozivatovic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2004. – 2012. Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Slavonski Brod
- 2012. – 2016. Opća gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod
- 2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek