

# Preventivno djelovanje L-arginina pri nastanku oksidativnog oštećenja i kristalizacije u staničnom modelu oksalatne urolitijaze distalnih bubrežnih tubula

---

Mikulčić, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:061980>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

Mateja Mikulčić

**PREVENTIVNO DJELOVANJE L-ARGININA PRI NASTANKU**  
**OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA I KRISTALIZACIJE U STANIČNOM**  
**MODELU OKSALATNE UROLITIJAZE DISTALNIH BUBREŽNIH**  
**TUBULA**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek

Mentor rada: Doc. dr. sc. Martina Smolić dr. med.

Rad ima \_\_\_\_\_ listova, \_\_\_\_\_ tablica i \_\_\_\_\_ slika.

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Smolić na bezgraničnom razumijevanju, strpljenju i pruženom znanju tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem i djelatnicima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Osijek, posebice Luciji Kuni i Tei Omanović na njihovom pruženom vremenu, razumijevanju i nesebičnoj pomoći tijekom praktičnoga dijela istraživanja za ovaj rad. Posebice veliku zahvalu upućujem svojoj obitelji za svu pruženu podršku i ljubav tijekom svih mojih godina dosadašnjeg obrazovanja.

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Urolitijaza .....	1
1.1.1. Rizični faktori.....	1
1.1.2. Mehanizmi nastanka urolitijaze.....	2
1.1.3. Farmakoterapija urolitijaze.....	3
1.1.4. Oksidativno oštećenje bubrežnih tubula i nastanak urolitijaze.....	4
1.2. L-arginin.....	5
1.2.1. Primjena L-arginina u liječenju kardiovaskularnih bolesti.....	6
1.2.2. Primjena L-arginina u liječenju bubrežnih bolesti.....	7
1.2.3. Primjena L-arginina u liječenju upalnih bolesti.....	8
2. Hipoteza.....	9
3. Cilj.....	10
4. Materijali i metode.....	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Materijali.....	11
4.3. Metode.....	11
4.4. Statistička analiza.....	15
5. Rezultati.....	16
5.1. Ispitivanje toksičnosti.....	16
5.2. Ispitivanje utjecaja L-arginina na nastanak kristala kalcijevog oksalata.....	19
5.3. Ispitivanje ekspresije izvanstanične dismutaze (SOD).....	22
6. Rasprava.....	24
7. Zaključak.....	27
8. Sažetak.....	28
9. Summary.....	29
10. Reference.....	30
11. Životopis.....	33

# 1. UVOD

## 1.1. Urolitijaza

Urolitijaza je sve češća, rekurentna bolest koja zahvaća čitav urinarni trakt gdje potencijalno ostavlja trajne posljedice, a definira se kao patološki nastanak makroskopske kalcifikacije unutar urinarnog sustava. (1) Kao zdravstveni problem, s obzirom na dosadašnje arheološke pronalaskе, smatra se da urolitijaza postoji već stoljećima, a rastući je problem i u današnje vrijeme (2).

S obzirom na lokaciju formiranja, te ponekad i zadržavanja kalcifikacije, tipove urolitijaze možemo podijeliti na tri vrste:

- a) Nefrolitijaza – pijesci ili kamenci u području sabirnog sustava samog bubrega
- b) Ureterolitijaza – pijesci ili kamenci u području uretara
- c) Cistolitijaza – pijesci ili kamenci nastali u mokraćnom mjehuru (3).

Bitno je također napomenuti kako je urolitijaza bolest koja pogađa i odrasle i djecu te pojedinci u bilo kojoj životnoj dobi imaju određenu mogućnost, s obzirom na njihovu zastupljenost rizičnih faktora, oboljeti od ove bolesti, iako je ipak najčešća u ljudi odrasle i starije dobi (4).

### 1.1.1. Rizični faktori

Urolitijaza predstavlja veliki rastući problem modernog društva. Statistike pokazuju kako u Sjedinjenim Američkim Državama čak 10,6 % muškaraca, odnosno 7,1 % žena razvije kamence u urinarnom traktu (5). Veća učestalost urolitijaze u muškaraca može se objasniti prisutnošću androgenih receptora koji imaju svojstvo reguliranja p22-PHOX podjedinice bubrežne epitelijalne NADPH oksidaze na transkripcijskoj razini što omogućuje povećanje oksalatne biosinteze i oksidativnog stresa koji se pojavljuju uz stanja oštećenosti bubrežnih tubula (6).

Ovo je također stanje koje češće pogađa osobe koje zbog lošeg životnog stila pate od pretilosti, oboljele od *diabetesa mellitusa*, osobe koje pate od hipertenzije te pokazuju laboratorijske znakove hiperlipidemije te osobe pretežito sedentarnih zanimanja i stila života

(7, 8). Konkretno, u slučaju razvoja kamenca kalcijevog oksalata u oboljelog, prvotna stanja koja bi mogla biti jedan od uzroka razvoja urolitijaze, a time i rizik za razvoj takve vrste urolitijaze, primarni su hiperparatiroidizam, dulji periodi mirovanja, višak vitamina D, kronična dijareja, kronični pankreatitis, Chronova bolest, nefrokalcinoza, primarna hiperoksalurija te Cacchi-Ricci bolest. Oboljeli od urolitijaze mogu biti i tzv. idiopatski slučajevi bez određenoga sistemskog uzroka koji bi mogao stajati iza povećanog rizika za razvoj urolitijaze (8).

### **1.1.2. Mehanizmi nastanka urolitijaze**

Najbolji uvjeti za razvoj kamenca u urinu su superzasićen, kiseo urin, tj. urin malenog volumena s prekomjernom količinom u urinu prisutnih minerala (8). O samoj vrsti minerala ovisi i vrsta kamenca, a vrstu minerala koji će prevladati može diktirati i određeno već prisutno patološko stanje u organizmu pojedinca (npr., kamenci magnezij amonijevog fosfata heksahidrata u slučaju prisutne urinarne infekcije bakterijama koje sadrže enzim ureazu) (8, 9).

Sam nastanak kamenca uvjetuje formacija kristala u tubularnoj tekućini te njihova retencija u bubrežnim kanalima. Trenutno postoje tri teorije o nastanku kamenaca:

- a) Model slobodnih čestica – razvoj kristalnih jezgara u lumenu nefrona tijekom ekstremno visoke zasićenosti urina filtriranim solima
- b) Model adheriranih čestica – razvoj kristalnih jezgara adheriranih na površinu lumena uslijed renalnog oštećenja zbog prekomjerne količine tubularnih oksalata
- c) Randallov plak – zasad etiološki nedovoljno istraženo oštećenje bazalne membrane Henleove petlje u kombinaciji s matriksom bogatim glikozaminoglikanima te tubularne okoline bogate mineralima stvara upalno prolitogenično stanje i plakove kalcijevog fosfata koji se kasnije mogu razviti u kamence (9).

Svi spomenuti mehanizmi u konačnici rezultiraju formiranjem bubrežnog kamenca u jednom od dijelova mokraćnog sustava, tj. vode do nastanka urolitijaze, kod kojeg kamenac svojom prisutnošću i prolaskom kroz mokraćni sustav, zbog svoga osebujnog sastava i veličine, uzrokuje oštećenje tubularne sluznice i potencijalnu opstrukciju bubrežnih i mokraćnih puteva (10).

Smanjeno izlučivanje citrata pokazalo se kao još jedan od predispozicijskih faktora za potencijalni nastanak kristala kalcijevog oksalata u mokraćnom sustavu, no kao jedini prisutni rizični faktor u pacijenta, bez prisutnosti ostalih predispozitora, nije dovoljan za nastanak kalcij oksalatne nefrolitijaze (11).

### **1.1.3. Farmakoterapija urolitijaze**

Jedan od uobičajenih lijekova za prevenciju urolitijaze uzrokovane kalcijevim kristalima u osoba s povećanim rizikom od njihovog razvoja ili osoba s već prisutnom poviješću bolesti te za tretiranje trenutno oboljelih su lijekovi na bazi citrata (13). Citrat inhibira kristalizaciju i samim time smanjuje i usporava ili sprječava formiranje kalcijevih kamenaca u mokraćnom sustavu (12). Najčešće se koristi u terapiji pacijenta s renalnom tubularnom acidozom distalnih tubula, hipocitratirijom te kod pacijenata s ponavljajućom prisutnošću kalcij oksalatnih kamenaca i kalcij fosfatnih kamenaca s mogućom zamjenom u obliku kalijevog bikarbonata u pacijenata s intolerancijom na citrat (13).

Lijekovi s duljom poviješću korištenja u slučajevima urolitijaze su tiazidski diuretici koji se koriste kod oboljelih od urolitijaze u obliku hidroklorotiazid te klorotiazida još od pedesetih godina 20. stoljeća (13). Tiazidi se mogu koristiti u oboljelih sa i bez hiperkalciurije, a korištenje se također preporuča u obliku profilakse u slučajevima ponavljajućih nastanaka kamenaca u pacijenata bez sekundarnih uzroka urolitijaze poput renalne tubularne acidoze, enterične hiperoksalurije, infekcija urinarnog trakta te poremećaja s uzročnom hiperkalcijemijom. (11, 12)

Jedni su od novijih lijekova za urolitijazu čije se djelovanje još istražuje, a uporaba usavršava, lijekovi na bazi fosfata, najčešće ortofosfatni lijekovi (14). Smatra se da fosfat smanjuje ekskreciju kalcija uz pomoć inhibicije sinteze kalcitriola te samim time i hiperkalciuriju i pojačan nastanak kalcijevih kristala i kamenaca (15, 13). Predlaže se kao potencijalno koristan lijek za bolesnike s idiopatskom slikom bolesti, bez sekundarnih uzroka, no zbog prisutnosti većeg broja nuspojava, posebice probavnih, još nije idealno terapijsko rješenje (15).

Kamenci dijametra većeg od 7 mm zahtijevaju kiruršku intervenciju uretroskopije ili perkutane nefrolitomije u svrhu njihovog uklanjanja dok kamenci dijametra 5 mm i manje (karakteristika 90 % slučajeva) mogu proći kroz urinarni trakt i izaći s urinom (16, 17). Osamdeset posto kamenaca koje ljudi razviju su kalcijevi kamenci (kamenci kalcijevog



oksalata i kalcijevog fosfata), 10 % struviti (kamenci magnezij amonijevog fosfata heksahidrata), 9 % kamenci mokraćne kiseline, te u 1 % spadaju kamenci ostalih vrsta (kamenci cistina, amonijevog kiselog urata, itd.) (17).

#### **1.1.4. Oksidativno oštećenje bubrežnih tubula i nastanak urolitijaze**

Oksidativno oštećenje je proces koji uzrokuje oštećenje staničnog tkiva, a nastaje uslijed povećanog unosa natrija; karakterizira ga stvaranje slobodnih radikala kisika tijekom aerobnih metaboličkih procesa (18). Proces koji ovo omogućuje povećana je NAD(P)H oksidazna aktivnost te smanjene ekspresije superoksidne dismutaze (19). Također, oksidativni je stres izrazito ključan dio u nastanku kristala kalcijevog oksalata koji ultimativno izgrađuju oksalatne bubrežne kamence (20, 21). Visoki unos natrija samim time uzrokuje i hiperoksaluriju koja pak, uz nastanak urolitijaze, pogoduje staničnom oštećenju te staničnoj apoptozi, a sve spomenuto je, također uslijed povećane količine natrija u hiperoksaluričnim bubrezima, uzrokovano i s posljedičnom smanjenom aktivnošću obrane od prekomjerne lize stanica u tubulima koja se uobičajeno uspostavlja uz pomoć uspješne regulacije aktivnosti SLC26A6 transportnog proteina oksalata koji pospješuje ekskreciju oksalata kroz probavni sustav dok citrat u mokraćnom sustavu djeluje kao kelator kalcijevih iona, smanjujući slobodne kalcijeve ione koji bi se dalje mogli vezati s oksalatima i formirati kamence (21, 22).

Na daljnjoj imunološkoj i staničnoj razini, ovakav tip tkivnog oštećenja također uzrokuje pojačanu proizvodnju i izlučivanje upalnih molekula poput osteopontina te monocit-kemoatraktantskog proteina-1 (MCP-1) i različitih vrsta podjedinica inter-alfa-inhibitora poput bikunina (11).

Na molekularnoj razini, bitno je istaknuti i kako je otkriveno da je glavni proces za povećanje oksidativnog stresa uslijed većeg unosa natrija smanjenje ekspresije bakar i cink sadržavajuće superoksid dismutaze i magnezij superoksid dismutaze na razini mRNA uslijed povećanja NAD(P)H oksidazne aktivnosti, a kao dodatan proces uz ova zbivanja se spominje i povećana urinarna ekskrecija lipid peroksidaznih metabolita 8-izoprostana  $F_{2\alpha}$  i malondialdehida (21).

Tijekom posljednjih godina, istraživači su pokušali pronaći potencijalno anti-urolitijska djelovanja pojedinih tvari uz pomoću kojih bi se spomenuta oksidativna oštećenja, a time i nastanak urolitijaze te njenih daljnjih negativnih posljedica na renalno zdravlje pojedinca, mogla smanjiti. Primjerice, istraživala su se zaštitna svojstva tvari poput bioaktivnog ekstrakta

Poria gljive koja su pokazala značajnu sposobnost antioksidativne aktivnosti te smanjenja oksidativnog staničnog oštećenja na LLCPK1 tubularno epitelnim stanicama (21), a slične rezultate je pokazalo i istraživanje zaštitnih svojstava N-acetilcisteina na Madin-Darby psećim bubrežnim stanicama koje je također polučilo značajne rezultate u prilog smanjenja oksidativnog stresa u stanica izloženim kalcijevom oksalatu te tretiranim N-acetilcisteinom (24).

## **1.2. L-arginin**

L-arginin (2-amino-5-guanidino-pentatonična kiselina) je za ljude neesencijalna amino kiselina, a sintetizira se endogeno u proksimalnim bubrežnim tubulima od aminokiseline citrulina kojeg nalazimo u gotovo svim vrstama stanica ljudskog organizma, sa sluznicom tankog crijeva kao najvećim izvorom citrulina za spomenutu sintezu. Zajedno, ovo se naziva intestinalno-renalna osovina za argininsku sintezu (23, 24). Osim u ovom procesu, smatra se da L-arginin sudjeluje i u procesima proizvodnje kreatina, L-ornitina (u procesu popravka tkiva), L-glutamata te različitih poliamina. U zdravom ljudskom serumu nalazimo između 50 i 150  $\mu\text{M}$  L-arginina, a smatra se da ga se u zdravoj modernoj prehrani hranom unese oko 5 g (25, 27, 28).

Supstrat je i za djelovanje enzima dušični oksid sintetaze (NOS) koji stvara dušični oksid (NO), odgovoran za nonadrenergičnu i nonkolinergičnu neurotransmisiju, neuroprotekciju, za pravilan rad krvnih žila te za smanjenje krvnog tlaka zbog svog vazodilatacijskog djelovanja, a koriste ga i stanice imunološkog sustava gdje služi za stanično signaliziranje i oksidativno baktericidno djelovanje (25, 26). Postoje tri različite izoforme NOS-a: neuronalna (nNOS ili NOS I), inducibilna (iNOS ili NOS II) te endotelijalna (eNOS ili NOS III), od kojih nNOS i eNOS proizvode NO u manjim količinama, a regulira ih kalcij, tj. kalmodulin, dok je iNOS aktivna uglavnom samo u upalnim stanicama, a aktivira se citokinom stimulacijom, neovisna je o kalciju i proizvodi NO u većim količinama (26, 27). Mehanizam reagiranja NOS-a uključuje dvoelektronski prijenos od molekularne forme kisika uz pomoć nekolicine kofaktora do L-arginina, što rezultira s otpuštanjem NO-a i L-citrulina, a N $\omega$ -hidroksi-L-arginin se formira kao stabilan nusprodukt (27).

Među tvarima koje razgrađuju arginin radi proizvodnje ostalih biološki bitnih tvari nalazimo enzim arginazu, čija je uloga njegova razgradnja radi produkcije uree, prolina te poliamina (26). Arginaza I razgrađuje arginin u jetri u procesu stvaranja ornitina, no pošto se

kasnije ornitin koristi za formiranje citrulina te naposljetku ponovno arginina, ovaj proces ne uzrokuje značajan manjak arginina u organizmu, dok u mitohondrijima pak nalazimo i drugi oblik ovog enzima – arginazu II, čija je konkretna uloga manje poznata, a nalazi se ne samo u jetri, već i u bubrežnim stanicama (28, 29).

### **1.2.1. Primjena L-arginina u liječenju kardiovaskularnih bolesti**

U kardiovaskularnom sustavu, NO ima snažno zaštitno djelovanje od brojnih bolesti ovog sustava. Proizveden od strane eNOS-a kao odgovor na stimulaciju mehanoreceptora zbog pritiska tekuće krvi koja kola kroz vene, ključan je za održavanje homeostaze vaskularnog tonusa, interakcija između vaskularnih zidova i cirkulirajućih krvnih stanica te općenito za održavanje pravilne vaskularne strukture. Manjak uspješnog djelovanja NO-a u krvožilnom sustavu može za posljedicu imati nastanak ili napredak bolesti poput hipertenzije, ateroskleroze te dijabetičke angiopatije, iako njegova prekomjerna proizvodnja od strane iNOS-a u stanju septičnog šoka može uzrokovati potpuno suprotno – manjak arterijske elastičnosti (28).

Izuzev samog pritiska krvnog toka kroz lumen žile, aktivacija eNOS-a je također pokrenuta putem biokemijskih stimulansa poput acetilkolina ili bradikina. Svi navedeni stimulansi uzrokuju aktivaciju receptora na endotelijalnoj staničnoj površini lumena krvnih žila, a zatim i unos unutarstaničnog kalcija, što naposljetku uzrokuje aktivaciju eNOS-a i proizvodnju NO-a. NO stvoren unutar endotelijalnih stanica zatim procesom difuzije prelazi u stanice glatkog mišićja te uz pomoć stimulacije guanilat ciklaza puta i posljedičnog stvaranja cikličnoga gvanozin monofosfata uzrokuje vazodilataciju. Jednako djelovanje poput opisanog djelovanja endogeno proizvedenog NO-a ima i NO otpušten u cirkulaciju i uz pomoć vanjskih farmakoloških sredstava, poput natrijevog nitroprusida i nitroglicerina te se ovo naziva endotel-nezavisna vazodilatacija (29).

U slučaju oboljelih od hipertenzije, L-arginin u obliku dodataka prehrani može značajno smanjiti i sistolički i dijastolički tlak za 2.2 do 5.4 mm Hg u slučaju sistoličkog te 2.7 do 3.1 mm Hg u slučaju dijastoličkog tlaka. Ovakvo smanjenje tlaka, posebice sistoličkog, povezano je s čak 14 % manjim rizikom za doživljavanje srčanog udara te 9 % manjim rizikom za obolijevanje od ostalih kardiovaskularnih bolesti (27). Već intravenozna doza od 30 g/L-arginina pospješuje vazodilataciju u ljudi unutar 30-minutnog vremenskog perioda te je pokazala pozitivne rezultate u tretiranju oboljelih od koronarno arterijskih bolesti, no ne i u

oboljelih od primarne pulmonarne plućne hipertenzije. Ovakav tip izazvane vazodilatacije je u istraživanjima bio praćen i s većim izlučivanjem NO metabolita nitrita i nitrata putem mokraće te se može zaključiti kako je ovaj proces definitivno NO-ovisan, no druga istraživanja pak pokazuju kako vazodilatacijskom djelovanju potpomaže i L-argininom izazvano izlučivanje hormona poput hormona rasta te inzulina. Bitno je i napomenuti kako se dnevna doza L-arginina manja od 15 g pokazala farmakološki nedjelotvornom na krvožilni sustav (28).

### **1.2.2. Primjena L-arginina u liječenju bubrežnih bolesti**

Osim povoljnog učinka na visok krvni tlak, L-arginin je pokazao pozitivna svojstva u tretiranju bubrežnih patoloških stanja. Naime, u bubrežnih bolesti s posljedicom smanjenja bubrežne mase, također je posljedica i smanjena količina proizvedenog NO-a te arginina općenito, što uzrokuje povećan oksidativni stres i tkivna oštećenja. U slučajevima blažih bubrežnih patoloških stanja, ovo se može smanjiti ili usporiti uz pomoć kombinacije povećane količine plazmatskog citrulina i nastale proksimalne tubularne hipertrofije, što u kombinaciji održava dostatnu proizvodnju L-arginina (30). Slučaj paralelnog pada funkcije bubrežnog tkiva i koncentracije arginina se posebice može primijetiti u oboljelih od mnogih oblika kroničnih bubrežnih bolesti s rezultirajućim kroničnim bubrežnim zatajenjem (31).

Slično se pokazalo i u istraživanjima na štakorskom modelu o utjecaju smanjene funkcije NOS enzima u oboljelih od akutnog otkazivanja bubrežne funkcije, gdje se manjak arginina, endotelijalne NOS III ekspresije i NO-a pokazao kao akcelerator tkivnog propadanja, korelirajući s padom glomerularne filtracije (32).

U slučajevima različitih vrsta glomerulonefritisa pak nalazimo na podijeljena mišljenja i rezultate. U slučajevima mezangioproliferativnog glomerulonefritisa, Wegenerove granulomatoze, lupus nefritisa te čak i u slučajevima odbacivanja transplantata bubrega nailazimo na povećanu ekspresiju iNOS mRNA te povećanu količinu NO-a koja korelira s histološkim znakovima renalnog oštećenja i gubitka tkivne funkcije. Slično je otkriveno i u slučaju modela štakora s anti-timocitni serum (ATS) induciranim glomerulonefritisom gdje je indukcija NOS-a rezultirala sa značajnim smanjenjem liziranih stanica i oštećenog tkiva. S druge strane, u slučaju tretiranja životinjskog modela štakora s nefrotoksičnim globulinom, a zatim i arginazom u svrhu smanjenja količine arginina u organizmu životinje, pokazano je kako ovakvo smanjenje arginina uzrokuje drastično pogoršanje renalnog stanja životinje te

dolazi do zaključka kako bi NO ipak mogao imati bitnu ulogu u smanjenju i ograničavanju glomerularne štete u ovom životinjskom modelu. Testiranje smanjenja funkcije iNOS-a u miševima oboljelima od antiglomerularnog glomerulonefritisa bazalne membrane je zanimljivo također po tome kako nije pokazalo ni pozitivne ni negativne rezultate s obzirom na smanjenje ili pogoršanje bolesti (33).

Prijašnje istraživanje utjecaja L-arginina i vitamina E kao potencijalnih antioksidansa protiv oksidativnog oštećenja kalcijevog oksalata na staničnim linijama MDCK I, MDCK II I LCP-K1 je pokazalo kako prethodni tretman L-argininom i vitaminom E, svaki zasebno, zaista uzrokuju veće preživljavanje stanica nakon tretiranja kalcijevim oksalatom (34) te u ovome radu nastavljamo istraživanje ovog otkrića.

### **1.2.3. Primjena L-arginina u liječenju upalnih bolesti**

Još jedna od potencijalno korisnih primjena L-arginina u farmaceutske svrhe je u tretiranju upalnih bolesti. L-arginin se naime pokazao kao uspješan dio održavanja zdrave intestinalne imunohomeostaze sa sposobnošću zacjeljivanja intestinalne mukozne sluznice i usporavanjem infiltracije upalnih stanica u tkivo u slučajevima oboljelosti od kolitisa (35). Pokazalo se i da smanjena količina L-arginina u krvi oboljelog korelira sa stadijem uznapredovanog ulceroznog kolitisa te je i ovo pokazatelj mogućnosti koristi L-arginina u terapijske svrhe u slučaju upalnih crijevnih bolesti (35, 36).

Smatra se da bi ovakvo djelovanje L-arginina mogli pripisati nekoliko različitih mehanizama. Prvi je mehanizam sustava oksidacije. Naime, upalna bolest crijeva je često praćena s većom količinom uznapredovalih oksidacijskih proteinskih produkata (noviji marker oksidativnog oštećenja tkiva), malondialdehida (indikator lipidne peroksidacije) s istovremeno smanjenom količinom SOD-a. Veća količina SOD-a pak uzrokuje suprotne rezultate i umanjuje oksidativnu štetu. Drugi mehanizam je vezan uz imunološki sustav crijeva, koji je u slučaju upalnih bolesti ovoga organskog sustava izrazito narušen sa smanjenim imunoglobulinom A, povećanom apoptozom limfocita u Peyerovim pločama, povećanom ekspresijom interleukina-17 i TNF- $\alpha$ , dok uvođenje dijeta bogate L-argininom u nekoliko životinjskih modela uzrokuje, kao što smo već naveli, potpuno suprotnu promjenu kretanja ovih vrijednosti i poboljšanje stanja oboljelog tkiva. Treći mehanizam govori o pozitivnom učinku L-arginina na crijevnu mikrofloru, a istražuju se i ostale mogućnosti (36).

Još jedan zanimljiv podatak je protuupalno svojstvo asimetričnog dimetilarginina (ADMA) čiji se porast, zajedno sa smanjenjem upalnih biomarkera (poput interleukina-6, prokalcitonina i C-reaktivnog proteina) povezuje s poboljšanjem upalne bolesti. Jedini preostali zbunjujući faktor je činjenica kako NO, čije povećane količine su prisutne uz povećane količine L-arginina, može imati i protu i antiupalna svojstva te se ovi konkretni mehanizmi protuupalne obrane i djelotvornosti još istražuju (37).

## **2. HIPOTEZA**

Primjena L-arginina prevenira razvoj oksidativnog oštećenja i kristalizacije u staničnom modelu oksalatne urolitijaze distalnih bubrežnih tubula.

### **3. CILJ**

Cilj ovoga istraživanja je odrediti toksični učinak oksalata u različitim koncentracijama i u različitom vremenskom periodu izloženosti na epitelnim stanicama distalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK1 te odrediti učinak antioksidansa L-arginina pri različitim koncentracijama na proces kristalizacije i izražaj mRNA superoksid dismutaze u staničnom modelu oksalatne urolitijaze distalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK1.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je odrađena u obliku laboratorijskog znanstvenog rada.

### 4.2. Materijali

Od kemikalija koristio se natrijev oksalat (pročišćen do  $\geq 99$  %) te L-arginin kupljeni od Sigma Chemicalsa (St. Louis, MO), stanice su se također tijekom pokusa po potrebi ispirale fosfatom puferaranom fiziološkom otopinom (PBS) te su se po potrebi tretirale tripsinom. Za određivanje vijabilnosti stanica korištena je boja „trypan blue“.

Korištena stanična kultura je *Madin-Darby canine kidney cells* podtipa I (MDCK I). Roditeljski MDCK stanični tip izoliran je iz zdravoga, odraslog koker španijela te je nekoliko podtipova izolirano i iz roditeljske stanične linije. MDCK I stanice imaju svojstva distalnih tubula zbog čega su prikladne za ovaj tip istraživanja te su velikodušan dar laboratorija profesora Carla Verkoelena u Urološkoj klinici Erasmus Medicinskog centra u Rotterdamu, Nizozemska.

### 4.3. Metode

Sav rad sa stanicama održavao se pod digestorom radi sprječavanja kontaminacije staničnih kultura, uz korištenje rukavica te pomne sterilizacije površina, korištenog pribora i unošenih predmeta. Za ispitivanje toksičnosti natrijevog oksalata, subkultivirane stanice smo prebacili iz petrijeve zdjelice u pločice sa šest jažica s medijem, stanice su inkubirane do konfluentnosti te su tretirane natrijevim oksalatom u padajućim koncentracijama te inkubirali u inkubatoru na 37 °C do idućeg dana, brojeći nastale kristale u idućih 6 sati. Drugi dan smo stanice ispirali PBS-om, odvojili od dna jažica tripsinizacijom te prebacili sadržaj u tubice od 1,5 mL, zajedno sa 0,5 mL medija (DMEM). Ukupan sadržaj smo zatim u količini od 10  $\mu$ L prenijeli u manje tubice te svakoj dodali i 10  $\mu$ L *trypan blue* boje za određivanje vijabilnosti stanica. Sadržaj svake tubice smo prenijeli u Neubauerov hemocitometar i prebrojili vijabilne stanice pod svjetlosnim mikroskopom pod srednjim povećanjem. Ovaj se dio istraživanja odradio u duplikatu.



*Slika 1 – Laboratorijski inkubator*

Za ispitivanje utjecaja antioksidansa, ponovno smo subkultivirane stanice iz petrijeve zdjelice prebacili u pločicu sa šest jažica s medijem te nakon inkubacije do konfluentnosti, medij isprali i dodali u svaku jažicu sljedeći sadržaj: u prvu jažicu smo stavili samo 2 mL medija (ukupna količina sadržaja u svakoj jažici mora biti 2 mL), u drugu jažicu smo stavili 1200  $\mu$ L DMEM-a s FBS-om te samo NaOx (800  $\mu$ L), u treću smo jažicu stavili ponovno obavezan medij (1998  $\mu$ L) + 2  $\mu$ L L-arginina, u četvrtu jažicu smo stavili najveću količinu L-arginina (0,5 ng/mL) te istu količinu NaOx-a kao i u drugu jažicu te i u preostale dvije jažice (800  $\mu$ L) + obavezan medij (1190  $\mu$ L), u petu jažicu smo stavili srednju količinu L-arginina (0,1 ng/mL medija) te istu količinu NaOx-a kao i u drugu i četvrtu te zadnju preostalu jažicu (800  $\mu$ L) + obavezan medij (1198  $\mu$ L) i u šestu jažicu smo stavili najmanju količinu L-arginina (0,05 ng/mL medija) te istu količinu NaOx-a kao i u sve prijašnje jažice koje su ga sadržavale (800  $\mu$ L) + obavezan medij (1199  $\mu$ L). Stanice smo zatim ostavili u inkubatoru tijekom idućih 24 sata i tijekom idućih 6 sati smo brojali novonastale kristale. Drugi dan smo sadržaj svake jažice tripsinizirali kao i u ispitivanju toksičnosti prebacili u tubice od 1,5 mL i dodali 0,5 mL medija, a zatim po 10  $\mu$ L prebacili u još manje tubice i dodali 10  $\mu$ L *trypan*

*blue* boje radi bojanja vijabilnih stanica u Neubeierovom hemocitometru pod svjetlosnim mikroskopom i srednjim povećanjem. Ovaj se dio istraživanja također odradio u dvije serije.



*Slika 2 – Radna stanica (tzv. „hood“) korištena u radu sa staničnim kulturama*

Nakon ispitivanja utjecaja L-arginina na staničnu kulturu tretiranu natrijevim oksalatom, uz pomoć komercijalnog RNeasy Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Njemačka), izolirana je ukupna stanična RNA iz testiranih staničnih kultura. Zatim je na temelju dobivene RNA sintetizirana cDNA uz pomoć komercijalno dostupnog seta (Prime Script First Strand cDNA Synthesis Kit, Takara Bio, Otsu-Shi, Japan). Dobivena sintetizirana cDNA je zatim kvantificirana lančanom reakcijom polimeraze (PCR, eng. *Polymerase chain reaction*) uz pomoć komercijalnog Taq PCR Core Kit-a (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Za kvantifikaciju SOD-a (izvanstanične superoksid dismutaze) korištena je standardna PCR metoda te početnice:

- a) 5'-ATGGTGGCCTTCTTGTTCTGC-3' i
- b) 5'-GTGCTGTGGGTGCGGCACACC-3'.

LDHA (laktat dehidrogenaza A) je korištena kao unutarnja kontrola za određivanje moguće prisutnosti različitih koncentracija cDNA uz sukladni PCR protokol, sa početnicama:

- a) 5'-TAATGAAGGACTTGGCAGATGAACT-3' i
- b) 5'-ACGGCTTTCTCCCTCTTGCT-3'.

Svi dobiveni uzorci čuvani su na 4 °C, a rezultati su bili vizualizirani uz pomoć elektroforeze na 0.8 % agaroznom gelu obogaćenom SYBR Safe bojom za gel te su dokumentirani snimačem gelova (*Gel Doc™ XR+ System*, Bio-Rad Ltd.).

Semikvantitativna analiza dobivenih rezultata učinjena je uz pomoć *Image Lab softvera* (verzija 5.2.1 build 11, Biorad, Hercules, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) te su daljnji dobiveni rezultati prikazani kao postotak u odnosu na kontrolu, tj. u odnosu na rezultate netretiranih stanica.

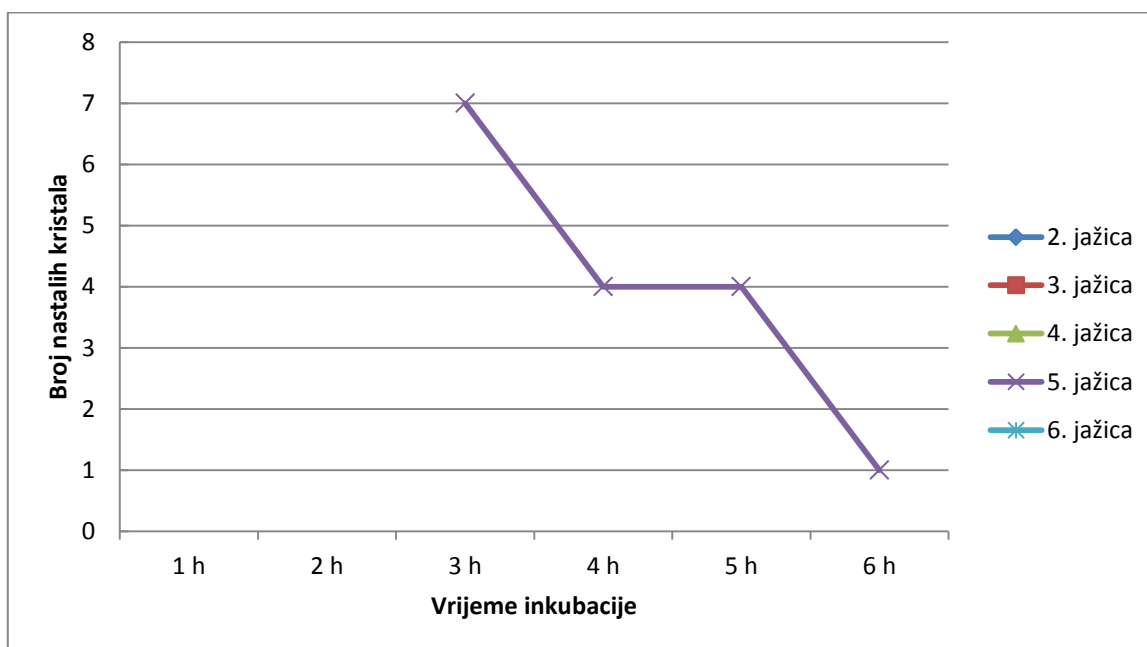
#### **4.4. Statističke metode**

Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u slučaju raspodjela koje ne slijede normalnu razdiobu medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike između dviju nezavisnih skupina normalno raspodijeljenih numeričkih podataka bit će testirane Studentovim T-testom, u slučaju da varijable ne slijede normalnu raspodjelu, koristit će se neparametrijski analog (Man-whitney U test). Statistička analiza obavljena je u programu *Statistica 10.0* (StatSoft, Tulsa, OK, USA), uz odabranu razinu značajnosti od  $\alpha=0.05$  (38).

## 5. REZULTATI

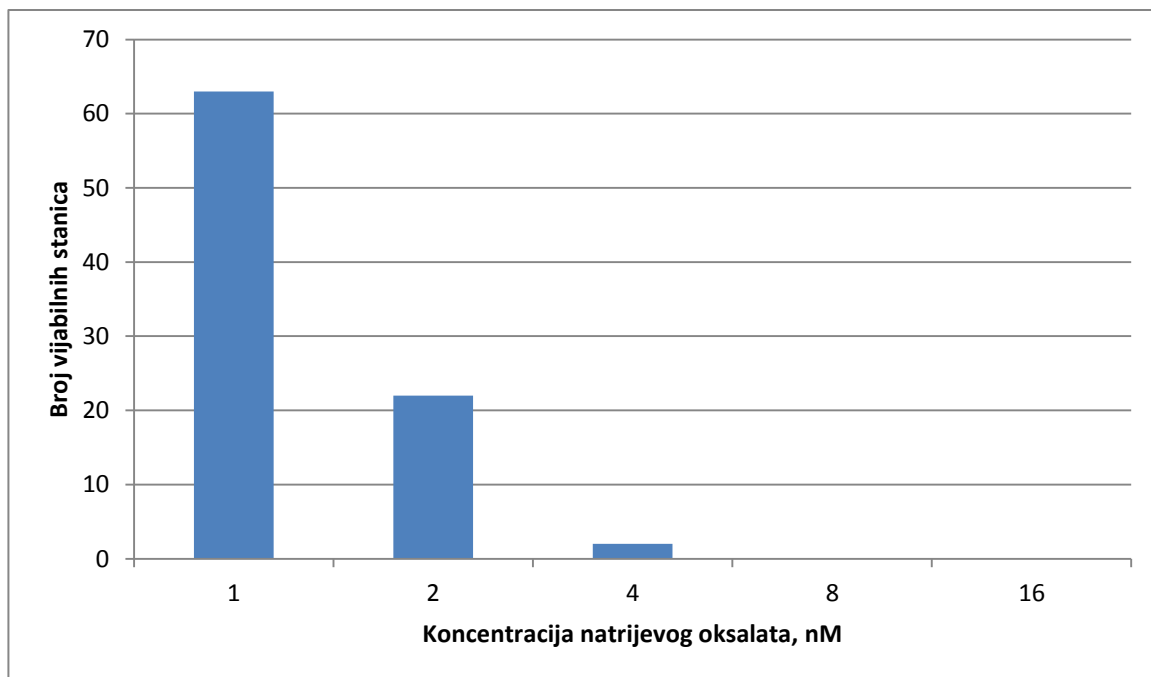
### 5.1. Ispitivanje toksičnosti

U prvoj seriji ispitivanja toksičnosti uočili smo početak formiranja kristalića tri sata nakon izlaganja stanica natrijevom oksalatu samo u petoj jažici koja je sadržavala 8 nM razrijeđenje natrijevog oksalata te pad broja nastalih kristalića tokom tijekom iduća tri sata. Rezultati su prikazani na slici 3 i tablici 1. (prikaz rezultata prve jažice je izostavljen zbog korištenja prve jažice kao slijepe probe u kojoj se nalazio samo medij).



Slika 3 – Prikaz broja nastalih kristala kroz vrijeme u prvoj seriji ispitivanja toksičnosti

Nakon kraja 24-satne inkubacije te daljnje obrade stanica u jažicama, sadržaj svake jažice prebacili smo u Neubauerov hemocitometar i mikroskopskim promatranjem uočili porast smrtnosti stanica s većom količinom prethodni dan dodanoga natrijevog oksalata. Rezultati su prikazani na slici 4 i tablici 1.

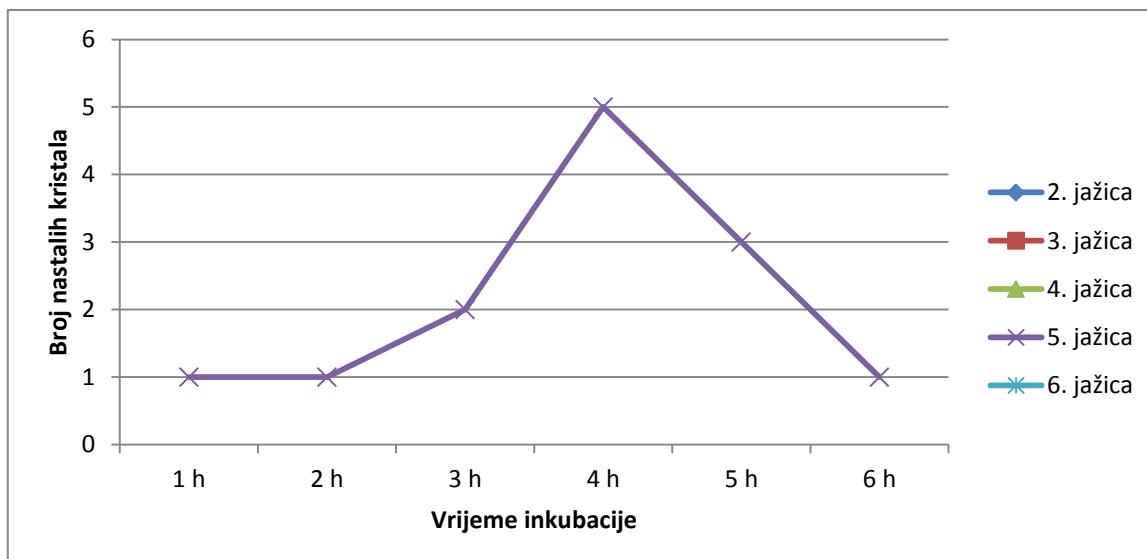


*Slika 4 – prikaz smanjenja vijabilnih stanica u odnosu na rastuću koncentraciju natrijevog oksalata*

	NaOx konc.	Br. stanica	Br. stanica/mL
2. jažica	1 nM	63	$3,2 \times 10^5$
3. jažica	2 nM	22	$1,1 \times 10^5$
4. jažica	4 nM	2	$0,1 \times 10^5$
5. jažica	8 nM	0	$0 \times 10^5$
6. jažica	16 nM	0	$0 \times 10^5$

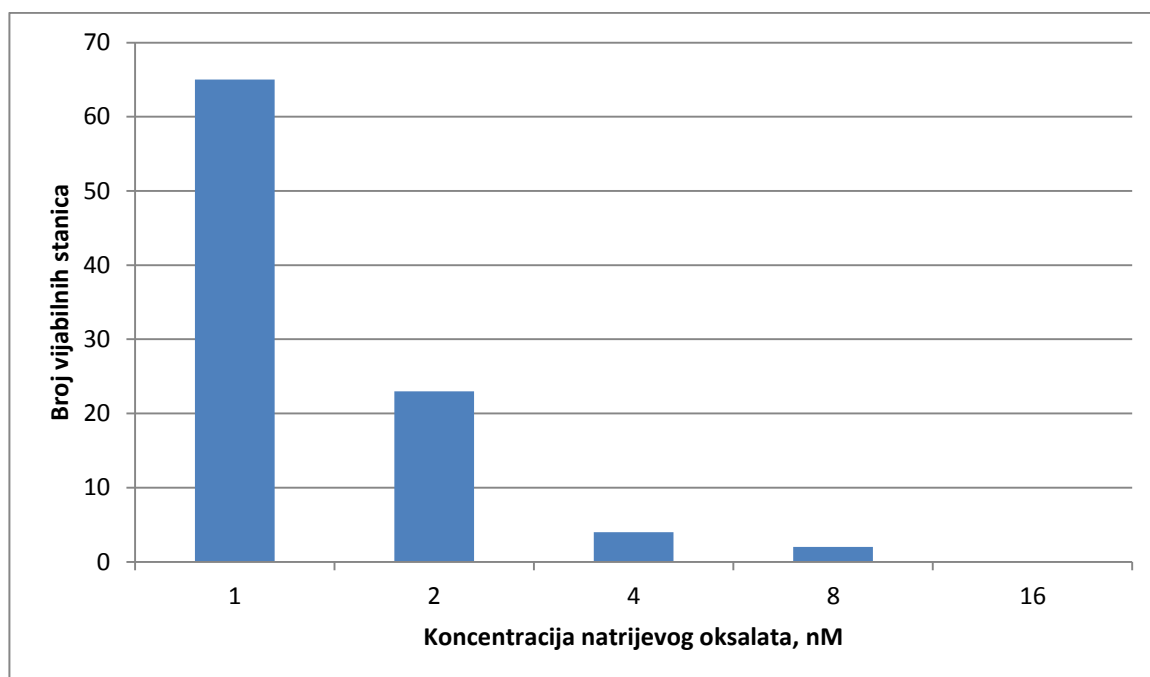
*Tablica 1 – Prikaz podataka o smanjenju vijabilnih stanica u odnosu na rastuću koncentraciju natrijevog oksalata*

Tijekom druge serije ispitivanja toksičnosti, nakon inkubacije stanica s natrijevim oksalatom, uočili smo ponovni nastanak kristala samo u petoj jažici sa 8 nM razrijeđenjem natrijevog oksalata već nakon prvog sata inkubacije te je taj broj rastao do četvrtog sata inkubacije, kada je počeo padati. Rezultati su prikazani na slici 5 (prva jažica, bez natrijevog oksalata, ponovno nije prikazana).



Slika 5 – Prikaz broja nastalih kristala kroz vrijeme u drugoj seriji ispitivanja toksičnosti

Nakon 24-satne inkubacije i daljnje obrade stanica u jažicama, jednako kao i u slučaju prve serije, sadržaj svake jažice promotrili smo i prebrojili uz pomoć Neubeierovog hemocitometra te ponovno primijetili porast smrtnosti stanica s većom količinom prethodni dan dodanoga natrijevog oksalata. Rezultati su prikazani na slici 6 i tablici 2.



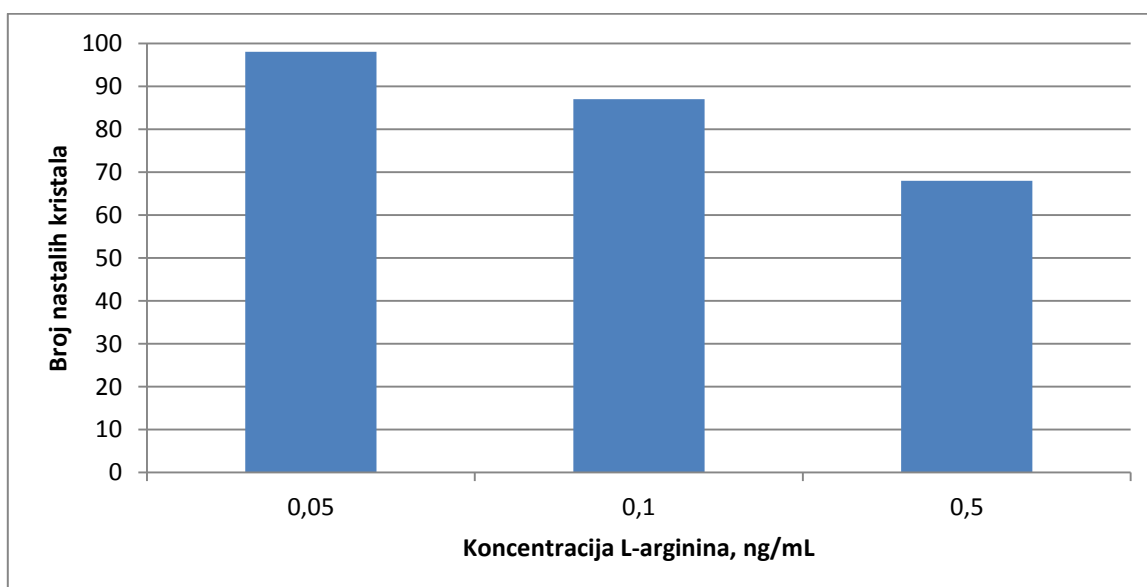
Slika 6 – Prikaz smanjenja vijabilnih stanica u odnosu na rastuću koncentraciju natrijevog oksalata

	NaOx konc.	Br. stanica	Br. stanica/mL
2. jažica	1 nM	65	$3,3 \times 10^5$
3. jažica	2 nM	23	$1,2 \times 10^5$
4. jažica	4 nM	4	$0,2 \times 10^5$
5. jažica	8 nM	2	$0,1 \times 10^5$
6. jažica	16 nM	0	$0 \times 10^5$

*Tablica 2 – Prikaz podataka o smanjenju vijabilnih stanica u odnosu na rastuću koncentraciju natrijevog oksalata*

## 5.2. Ispitivanje utjecaja L-arginina na nastanak kristala kalcijevog oksalata

Nakon šest sati inkubacije stanica testiranih u sklopu određivanja utjecaja L-arginina na nastanak oksalata, gdje su stanice bile izložene jednakim količinama natrijevog oksalata i padajućim koncentracijama L-argininom, izbrojali smo porast broja kristala u jažicama koji je korelirao sa smanjenjem koncentracije dodanog L-arginina. Jednak odnos je uočen i u brojanju kristala nakon dvadeset i četiri sata. Rezultati su prikazani na slikama 7 i 8 te tablicama 3 i 4.

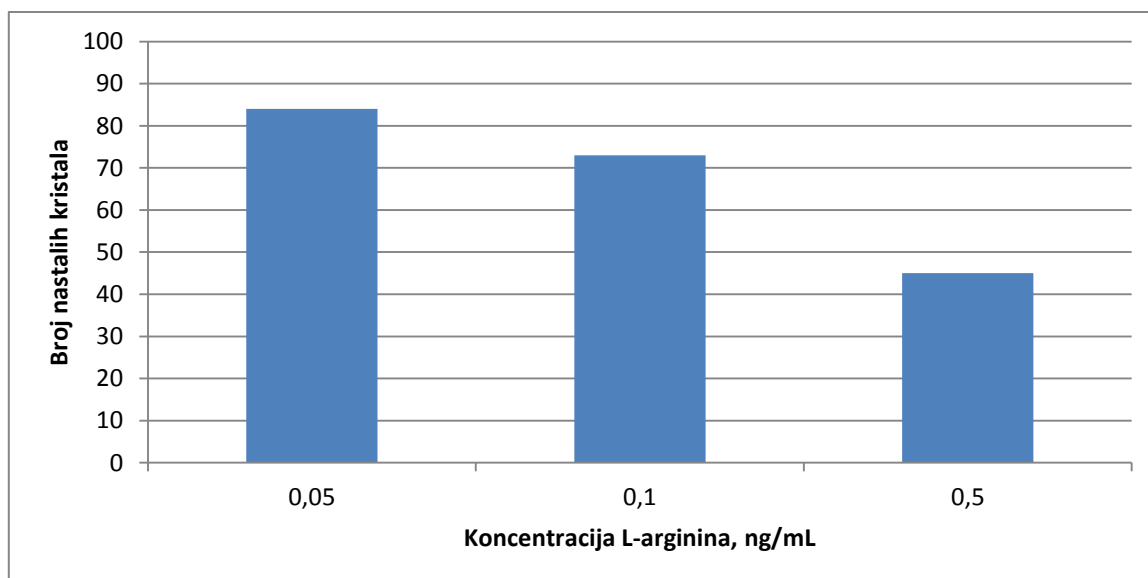


*Slika 7 – Prikaz odnosa koncentracije L-arginina i broja nastalih kristala u prvoj seriji ispitivanja utjecaja antioksidansa nakon 6 h*



Koncentracija L-arginina (ng/mL)	Broj nastalih kristala
0,05	98
0,1	87
0,5	68

*Tablica 3 – Prikaz odnosa nastalih kristala u odnosu na dodanu koncentraciju natrijevog oksalata (nakon 6 h)*

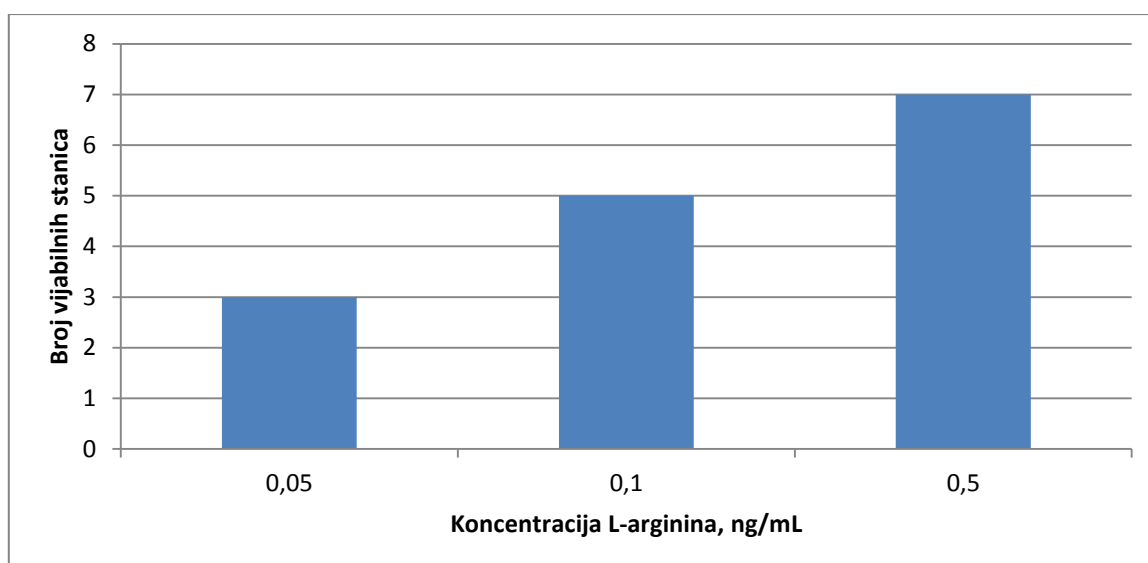


*Slika 8 – Prikaz odnosa koncentracije L-arginina i broja nastalih kristala u prvoj seriji ispitivanja utjecaja antioksidansa nakon 24 h*

Koncentracija L-arginina (ng/mL)	Broj nastalih kristala
0,05	84
0,1	73
0,5	45

*Tablica 4 – Prikaz odnosa nastalih kristala u odnosu na dodanu koncentraciju natrijevog oksalata (nakon 24 h)*

Nakon brojenja vijabilnih stanica u istraživanim jažicama nakon 24 sata, otkrili smo padajući broj izbrojenih vijabilnih stanica sa smanjenjem dodane koncentracije L-arginina u jažicama. Rezultati su prikazani na slici 9 i u tablici 5.



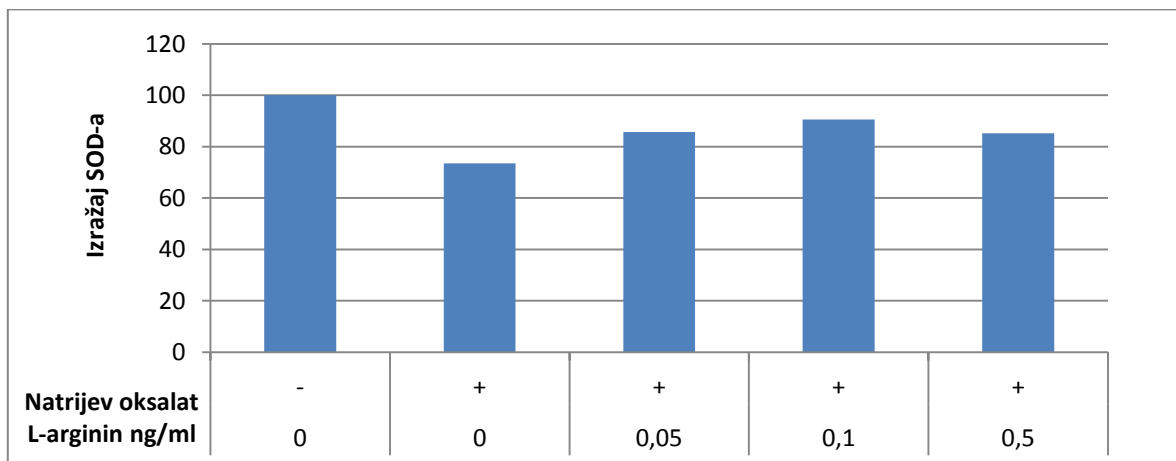
*Slika 9 – Prikaz odnosa izbrojenih vijabilnih stanica i koncentracije L-arginina*

Koncentracija L-arginina (ng/mL)	Broj vijabilnih stanica nakon 24 h
0,05	3
0,1	5
0,5	7

*Tablica 5 – Prikaz odnosa nastalih kristala u odnosu na dodanu koncentraciju natrijevog oksalata*

### 5.3. Ispitivanje ekspresije izvanstanične superoksid dismutaze (SOD)

Slijedeći obavljanje semikvantitativne analize ekspresije SOD-a na tretiranim stanicama, dobiveni rezultati su ukazali na veći postotak izražene SOD u stanica tretiranih L-argininom uz tretman natrijevim oksalatom (85,19 – 90,62 %), nego u stanica tretiranih isključivo natrijevim oksalatom, bez dodatka L-arginina (73,46 %), a manje od u potpunosti netretiranih stanica gdje je postotak izražaja potpun (100 %). Rezultati su prikazani u grafu 7 i tablici 5.



*Graf 7 – Prikaz odnosa postotka izražaja SOD-a nakon semikvantifikacije i dodane koncentracije L-arginina*

	Semi-kvant	Standardna devijacija	Ekspresija SOD-a / netretirane stanice (%)
Netretirane stanice	1 763 518	151	100
Tretirane NaOx	1 295 468	95	73,46
Tretirane NaOx i L-argininom (0,05 ng/mL)	1 512 413	121	85,76
Tretirane NaOx i L-argininom (0,1 ng/mL)	1 598 214	92	90,62
Tretirane NaOx i L-argininom (0,5 ng/mL)	1 502 354	101	85,19

*Tablica 5 – Prikaz odnosa semi-kvanta, standardne devijacije i postotka ekspresije SOD-a na tretiranost stanica natrijevim oksalatom i L-argininom*

## 6. RASPRAVA

Urolitijaza je bolest koju sve češće susrećemo u stresnom, sedentarnom i nezdravom životu današnjice. Pogada ljude svih životnih dobi, s većom prevalencijom u starijoj populaciji te se može pojaviti i uz nekolicinu primarnih bolesti poput hiperparatiroidizma, Chronove bolesti, *Diabetesa mellitusa*, hiperlipidemije, bolesti koje obilježavaju dulji periodi ležećeg ili sjedećeg mirovanja i sl. (4, 7, 8) Konkretno, oksalatna urolitijaza je jedna od najčešćih njenih vrsta i karakterizira je, između ostalog, i postepeno oksidativno oštećenje tubularnog tkiva uslijed prekomjerne količine prisutnih natrijevih iona koji uz pomoć povećane NAD(P)H oksidazne aktivnosti te smanjene ekspresije superoksidne dismutaze potpomažu stvaranju slobodnih radikala kisika tijekom aerobnih metaboličkih procesa ljudskog organizma. (18, 19, 21)

Iako postoji nekoliko sredstava kojima se može tretirati već nastala urolitijaza, poput terapije citratima, Tijazidom te određenim ortofosfatnim lijekovima (11, 13, 14), i dalje se traži adekvatna terapija kojom bi se u pojedinaca s visoko prisutnim rizičnim faktorima, mogla spriječiti prvotna ili ponovna pojava urolitijaze te njenih posljedičnih oštećenja dijelova mokraćnog sustava.

Jedna je od potencijalnih mogućnosti korištenje L-arginina, jedne od neesencijalnih amino kiselina, te njegovih pozitivnih svojstava u ovu svrhu (23). Kao jedan od ključnih faktora za stvaranje dušičnog oksida (NO) uz pomoć enzima dušični oksid sintetaze (NOS), zaslužan je na ovaj način za njegovo zaštitno i pozitivno terapijsko djelovanje na kardiovaskularni sustav, uz činjenicu da je dušični oksid bitan također i za optimalno funkcioniranje živčanog sustava (26, 28).

Poznato je kako arginin također nosi određena pozitivna svojstva u tretiranju bubrežnih bolesti, gdje smanjenje bubrežne mase dovodi do smanjene količine proizvedenog NO-a, uzrokujući povećani oksidativni stres i oštećenje bubrežnog tkiva te posljedično i smanjenje zdrave bubrežne funkcije (31, 32). Nažalost, pozitivno djelovanje arginina kao kofaktora u sintezi NO-a nije dokazano u svakoj bubrežnoj bolesti, već u određenim stanjima, primjerice kod mezangioproliferativnoga glomerulonefritisa, Wegenerove granulomatose i lupus nefritisa ima, dapače, negativno djelovanje (33).

Istraživanje samog utjecaja arginina na stanice suočene sa oksidativnim stresom je pokazalo kako izloženost prethodnom tretmanu arginina i vitamina E uistinu smanjuje smrtnost staničnih linija MDCK I, MDCK II te LLC-PK1 koje se nakon toga bile izložene kalcijevom oksalatu (34).

Pozitivna djelovanja L-arginina na održavanje opće homeostaze mokraćnog sustava su nas potakla da dalje istražimo njihov opseg te da provjerimo ako bi jednako tako zadovoljavajuće pozitivan utjecaj mogao imati i na zaštitu bubrežnog tkiva od mehanizama koji potiču nastanak oksalatne urolitijaze.

Naš je cilj bio odrediti točan toksični učinak različitih koncentracija oksalata s različitim vremenima izloženosti na MDCKI stanični podtip Madin-Darby stanica koker španijela sa svojstima stanica bubrežnih distalnih tubula te nakon toga odrediti učinak različitih koncentracija antioksidansa L-arginina na nastanak oksalata na jednakoj vrsti stanične kulture. Sav se rad odvijao u sterilnim uvjetima laboratorijskog digestora Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Osijek, uz stručni nadzor i pomoć djelatnika zavoda.

Tijekom testiranja toksičnosti kalcijevog oksalata na MDCKI stanice dobili smo rezultate koji su potvrdili kako su dodane veće koncentracije oksalata proporcionalne sa smanjenim brojem vijabilnih stanica izbrojanih idući dan u staničnoj kulturi, tj., u obje testirane serije, uočeno je proporcionalno smanjeno preživljavanje stanica s porastom dodane koncentracije kalcijevog oksalata. Kristali su uočeni u najvećem broju u kulturama s dodanom većom koncentracijom kalcijevog oksalata, s najvećim porastom u prva tri sata inkubacije, nakon čega je u iduća tri sata porast i postojanost kristala počela postepeno opadati zbog dosegnutog vrhunca djelovanja dodane koncentracije kalcijevog oksalata na korištenu staničnu kulturu.

Tijekom testiranja utjecaja L-arginina na toksičnost kalcijevog oksalata na MDCK I stanice uočeno je proporcionalno smanjenje porasta broja kristala i nevijabilnih stanica u kulturama s porastom dodane koncentracije L-arginina. Iz navedenog možemo zaključiti da su stanične kulture s većom količinom dodanog L-arginina doživjele smanjeno oksidativno oštećenje i općenito formiranje kristala dodanog kalcijevog oksalata.

mRNA analiza je ukazala na povećanje ekspresije enzima SOD (superoksid dismutaza) u uzorcima stanica koje su bile tretirane L-argininom, ukazujući time na postojeće pozitivno antioksidativno djelovanje uslijed primjene L-arginina.

U skladu sa svime navedenim, možemo zaključiti da L-arginin općenito ima povoljan utjecaj i zaštitno djelovanje na tkivo bubrežnih distalnih tubula uslijed povećane količine kalcija i kalcijevog oksalata u tubulima. Ovaj zaključak dodatno proširuje karakteristiku L-arginina kao povoljnog medijatora u održavanju funkcije i zdravlja renalnog tkiva te utvrđuje njegovu pozitivnu ulogu kao uspješnog antioksidansa protiv djelovanja kalcijevog oksalata.

Međutim, bitno je napomenuti kako bi se ovo opažanje trebalo dodatno istražiti u budućnosti, s više serija i više vrsta uzročnika oksidativnog stresa na stanično tkivo bubrežnih tubula i urolitijaze općenito. Također bi bilo izuzetno korisno obaviti daljnja testiranja antioksidativnih svojstava L-arginina kojima bi se mogla razviti adekvatna i precizna terapija L-argininom protiv nastanka i daljnjeg razvoja urolitijaze te je testirati daljnjim farmakološkim testiranjima za razvoj kompletnog lijeka dostupnog za javnu uporabu pojedinaca s većim rizikom obolijevanja od ovog stanja.

Uspješan razvoj ovakve terapije bi potencijalno omogućio daljnji korak u borbi protiv urolitijaze i njenih štetnih djelovanja, uz potencijalno posljedično smanjenje broja oboljelih i novooboljelih uz prikladnu i uspješnu terapiju u skupinama oboljelih i visokorizičnih pojedinaca.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i rezultata dobivenih njegovim uspješnim provođenjem, možemo zaključiti:

- Kalcijev oksalat ima prisutnu sposobnost uzorkovanja oksidativnog oštećenja s posljedičnim odumiranjem stanice proporcionalnim s porastom primijenjene koncentracije oksalata
- L-arginin odražava svoje sposobnosti kao antioksidans pokazujući zaštitno djelovanje na stanice distalnih bubrežnih tubula tretiranih kalcijevim oksalatom na način da smanjuje te sprječava nastanak i rast kristala kalcijevog oksalata.



## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti toksični učinak natrijevog oksalata u različitim koncentracijama i u različitom vremenskom periodu izloženosti na epitelnim stanicama distalnih bubrežnih tubula (MDCK1) te odrediti učinak antioksidansa L-arginina pri različitim koncentracijama na proces toksičnosti oksalata i kristalizacije i izražaj mRNA superoksid dismutaze u staničnom modelu oksalatne urolitijaze distalnih bubrežnih tubula (MDCK1).

**Nacrt studije:** Laboratorijska znanstvena studija.

**Materijali i metode:** Korištena stanična kultura je Madin-Darby, a dobivena je od psećih bubrežnih stanica podtipa I (MDCK I). Za ispitivanje toksičnosti, korišten je natrijev oksalat (pročišćen do  $\geq 99\%$ ) koji je inkubiran sa staničnom kulturom te se vijabilnost stanica nakon inkubacije pregledala bojenjem bojom „trypan blue“. Za ispitivanje zaštitnog djelovanja protiv oksalatne toksičnosti korišten je L-arginin kupljen od Sigma Chemicalsa (St. Louis, MO) koji se inkubirao s korištenim stanicama u zasebnoj seriji zajedno s natrijevim oksalatom.

**Rezultati:** Nakon inkubiranja stanica s različitim koncentracijama natrijevog oksalata, pokazano je kako natrijev oksalat uzrokuje značajno smanjenje vijabilnosti stanica proporcionalno s povećanjem njegove koncentracije. Jednako tako, otkriveno je kako su stanice inkubirane dodatno i s L-argininom pokazale značajno manje smanjenje vijabilnosti u usporedbi sa stanicama inkubiranim isključivo s natrijevim oksalatom.

**Zaključak:** L-arginin pokazuje uspješno zaštitno djelovanje na stanice distalnih bubrežnih tubula izloženima toksičnom djelovanju natrijevog oksalata te predstavlja potencijalno korisnu terapiju u liječenju urolitijaze.

**Ključne riječi:** arginin; bubreg; nefrologija; urolitijaza.

## 9. SUMMARY

**Objectives:** Determining the toxic effect of various concentrations of sodium oxalate in various time periods while exposing epithelial cells of distal kidney tubule cells (MDCK 1) to it and determining the effect of the L-arginine antioxidant on the crystallisation and toxicity of the sodium oxalate, as well as determining the mRNA expression of superoxide dismutase within our cell model of oxalate urolithiasis of distal kidney tubules (MDCK I).

**Study design:** The study was made in the form of a laboratory scientific research.

**Materials and methods:** The used cell culture was Madin-Darby, which was obtained from the subtype I canine kidney cells (MDCK I). For the purpose of toxicity testing, we used sodium oxalate ( $\geq 99\%$  purified) which was incubated with our cell culture. The viability of our cells after the incubation was observed by dying it with the trypan blue dye. For the purpose of testing possible protective effects, we used L-arginine obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO) which we incubated in separate testing series along with both our cells and sodium oxalate.

**Results:** After incubating our cells with various concentrations of sodium oxalate, it has been observed that sodium oxalate does indeed cause a significant reduction in the viability of our cells, which was proportionate to the concentration of sodium oxalate in use. Also, it was observed that cells incubated with both sodium oxalate and L-arginine displayed a significant reduction in the viability drop, compared to the cells incubated solely with the sodium oxalate.

**Conclusion:** L-arginin displayed a successful protective effect on distal tubule kidney cells which are under the toxic influence of the sodium oxalate and is thus presented as a potentially useful therapy in the treatment of urolithiasis.

**Key words:** arginine; kidney; nephrology; urolithiasis.

## 10. LITERATURA:

1. Benz-Bohm G, Hoppe B. *Pediatric Uroradiology*. 2. izd. Berlin, Germany: Springer; 2008.
2. López, M, Hoppe, B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol*. 2010;25:49–59.
3. Panigrahi PN, Dey S and Subash CJ Urolithiasis: Critical Analysis of Mechanism of Renal Stone Formation and Use of Medicinal Plants as Antiurolithiatic Agents. *Asian J Anim Vet Adv*, 2016;11:9–16.
4. Hoppe B, & Kemper MJ. Diagnostic examination of the child with urolithiasis or nephrocalcinosis. *Pediatr Nephrol*. 2010;25:403–413.
5. Ramaswamy K, Shah O. Metabolic syndrome and nephrolithiasis. *Transl Androl Urol*. 2014;3:285–295.
6. Liang L, Li L, Tian J, Lee SO, Dang Q, Huang CK, Chang C. Androgen Receptor Enhances Kidney Stone-CaOx Crystal Formation via Modulation of Oxalate Biosynthesis & Oxidative Stress. *J Mol Endocrinol*. 2014;28:1291–1303.
7. Soueidan M, Bartlett SJ, Noureldin YA, Andersen RE, Andonian S. Leisure time physical activity, smoking and risk of recent symptomatic urolithiasis: Survey of stone clinic patients. *Can Urol Assoc J*. 2015;9:257–262.
8. Gambaro G, Croppi E, Coe F, Lingeman J, Moe O, Worcester E, i sur. Metabolic diagnosis and medical prevention of calcium nephrolithiasis and its systemic manifestations: a consensus statement, *J Nephrol*. 2016;29:715–734.
9. Strakosha R, Monga M, Wong MYC. The relevance of Randall’s plaques. *Indian J Urol*. 2014;30:49–54.
10. Spivacow FR, Del Valle EE, Lores E, Rey PG. Kidney stones: composition, frequency and relation to metabolic diagnosis, *Medicina (B Aires)*. 2016;76:343-348.
11. Khan SR, Glenton PA. Experimentally induced hyperoxaluria in MCP-1 null mice. *Urol Res*. 2011;39:253–258.
12. Moe OW, Pearle MS, Sakhaee K. Pharmacotherapy of urolithiasis: evidence from clinical trials. *Kidney Int*. 2011;79:385–392.
13. Vigen R, Weideman RA, Reilly RF. Thiazides diuretics in the treatment of nephrolithiasis: are we using them in an evidence-based fashion? *Int Urol Nephrol*. 2011;43:813–819.

14. Xu H, Zisman AL, Coe FL, Worcester EM. Kidney stones: an update on current pharmacological management and future directions. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14:435–447.
15. Talati JJ, Tiselius HG, Albala DM, Ye Z. *Urolithiasis: Basic Science and Clinical Practice.* 1. izd. London, UK, Springer Science & Business Media; 2012.
16. Worcester EM, Coe FL. Nephrolithiasis. *Prim Care*, 2008;35:369–vii.
17. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol (Berlin, Germany)*, 2010;25:831–841.
18. Schulman A, Chaimowitz M, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. Antioxidant and Renoprotective Effects of Mushroom Extract: Implication in Prevention of Nephrolithiasis. *J Clin Med Res.* 2016;8:908–915.
19. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, i sur. Salt Intake, Oxidative Stress, and Renal Expression of NADPH Oxidase and Superoxide Dismutase, *J Am Soc Nephrol.* 2013;14:2775-82.
20. Huang HS, Ma MC, Chen J, Chen CF. Changes in the oxidant-antioxidant balance in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Urol.* 2002;167:2584-93.
21. Huang HS, Ma MC. High Sodium-Induced Oxidative Stress and Poor Anticrystallization Defense Aggravate Calcium Oxalate Crystal Formation in Rat Hyperoxaluric Kidneys. *PLoS ONE.* 2015;10:e0134764.
22. Ohana E, Shcheynikov N, Moe OW, Muallem S. SLC26A6 and NaDC-1 Transporters Interact to Regulate Oxalate and Citrate Homeostasis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24:1617–1626.
23. Schulman A, Chaimowitz M, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. Antioxidant and Renoprotective Effects of Mushroom Extract: Implication in Prevention of Nephrolithiasis. *J Clin Med Res.* 2016;8:908–915.
24. Fishman AI, Green D, Lynch A, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. Preventive Effect of Specific Antioxidant on Oxidative Renal Cell Injury Associated With Renal Crystal Formation. *Urology.* 2013;82:489–489.
25. Rodriguez PC, Ochoa AC, Al-Khami AA. Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol.* 2017;8:93.

26. McRae MP. Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses. *J Chiropr Med.* 2016;15:184–189.
27. Böger RH. The Pharmacodynamics of L-Arginine. *J. Nutr.* 2007;6:1650S-1655S.
28. Ash, DE. Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.* 2004;10:2760S-2764S.
29. Gornik HL., Creager MA. Arginine and Endothelial and Vascular Health. *J. Nutr.* 2004;10:2880S-2887S.
30. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease *Am J Physiol.* 2008;294:F1-F9.
31. Reddy YS, Kiranmayi VS, Bitla AR, Krishna GS, Rao PVLNS, Sivakumar V. Nitric oxide status in patients with chronic kidney disease. *Indian J Nephrol.* 2015;25:287–291.
32. Schramm L, La M, Heidbreder E, Hecker M, Beckman JS, Lopau K, i sur. L-Arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation, *Kidney Int.* 2002;61:1423–1432.
33. Cherla G, Jaimes EA. Role of L-Arginine in the Pathogenesis and Treatment of Renal Disease, *J. Nutr.* 2004;132:2801S–2806S.
34. Kizivat T, Smolić M, Marić I, Tolušić Levak M, Smolić R, Bilić-Čurčić I, i sur. Antioxidant Pre-Treatment Reduces the Toxic Effects of Oxalate on Renal Epithelial Cells in a Cell Culture Model of Urolithiasis, *Int. J. Environ.* 2017;14:109.
35. Fritz JH. Arginine Cools the Inflamed Gut, *Infect. Immun.* 2013;81:3500–3502.
36. Patel VB, Preedy VR, Rajendram R. *L-Arginine in Clinical Nutrition.* 1.izd. Springer International Publishing, Switzerland; 2017.
37. Antonaides C, Demosthenous M, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Vlachopoulos C, Toutouza M, i sur. Role of Asymmetrical Dimethylarginine in Inflammation-Induced Endothelial Dysfunction in Human Atherosclerosis, Hypertension. 2011;58:93–98.
38. Altman DG, *Practical Statistics for Medical Research.* 2. izd. Washington, Chapman & Hall/CRC; 2000.

## 11. ŽIVOTOPIS

**MATEJA  
MIKULČIĆ**

Studentica medicinsko laboratorijske dijagnostike

Luje Bezeredija 19  
40 000 Čakovec  
Hrvatska  
(+385) 98 961 6155  
(+385) 40 364 602  
mikulcic.mateja@gmail.com

### **OBRAZOVANJE**

**Diplomski studij, medicinsko laboratorijska dijagnostika** (Medicinski fakultet sveučilišta Josip Juraj Strossmeyer, Osijek – 2015 - trenutno)

**Preddiplomski studij, Medical Laboratory Diagnostics** (Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci, Rijeka – 2012 - 2015)

### **DODATNA IZOBRAZBA**

**Praksa i obrazovanje u području molekularne biologije** (Summer School of Science, S3++ programme, Višnjan – 2011, 2012)

**Praksa i obrazovanje u području kemije** (Summer Science Factory, Čakovec – 2010)

### **RADNO ISKUSTVO**

**Student istraživač** (Medicinski fakultet, Rijeka – 02/2015 – 06/2015)

- + Vođa projekta – prof. Smiljana Ristić, PhD
- + Praktični rad na projektu istraživanja utjecaj CCR5 $\Delta$ 32 genske mutacije na terapijski odgovor na interferon-beta u oboljelih od multiple skleroze na području Hrvatske i Slovenije

## VJEŠTINE

**Računalne vještine:** Iskusna s Microsoft Office-om (MS Word, MS PowerPoint, MS Excel), iskusna s MedCalc-om i Prism-om.

**Radne vještine:** Veoma uporna i marljiva, kreativna, organizirana u svakom aspektu posla, sposobna za kritičko i analitičko razmišljanje, pokazuje visoku razinu odgovornosti prema poslu, kolegama i okolini, fokusirana, izrazito voljna učiti i usavršavati se.

**Profesionalne vještine:** Obrazovana u radu u medicinskom i znanstveno-istraživačkom laboratoriju (vještine iz hematologije, histologije mikrobiologije, citologije, toksikologije, molekularne biologije, patologije i biokemije).

**Društvene vještine:** Odličan rad u timu, druželjubiva, izrazito voljna pomoći, suosjećajna prema drugima oko sebe, strpljiva i optimistična, uz iskustva volontiranja sa djecom s posebnim potrebama (udruga "DIRA").

**Jezične vještine:** tečno priča strane jezike engleski i njemačke, a trenutno uči talijanski i francuski, te ih priča na osnovnoj razini.

**Ostale vještine:** Iskusna u programima računalne grafičke obrade (GIMP)

## KONFERENCIJE

- Ristić Smiljana, Mikulčić Mateja, Starčević Čizmarević Nada, Lovrečić Luca, Lavtar Polona, Sepčić Juraj, Šega Jazbec Saša, Kapović Miljenko, Peterlin Borut. **Influence of CCR5Δ32 gene mutation on interferon-beta treatment response in multiple sclerosis.** 11th Balkan Congress of Human Genetics, Beograd, 17.-20. 09. 2015.