

# Djelovanje kofeina pri nastanku oksidativnog oštećenja i kristalizacije u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula (MDCK tip I)

---

**Banovac, Anamarija**

**Master's thesis / Diplomski 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:152:329332>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Anamarija Banovac**

**DJELOVANJE KOFEINA PRI  
NASTANKU OKSIDATIVNOG  
OŠTEĆENJA I KRISTALIZACIJE U  
STANIČNOM MODELU OKSALATNE  
UROLITIJAZE PROKSIMALNIH  
BUBREŽNIH TUBULA (MDCK TIP I)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Anamarija Banovac**

**DJELOVANJE KOFEINA PRI  
NASTANKU OKSIDATIVNOG  
OŠTEĆENJA I KRISTALIZACIJE U  
STANIČNOM MODELU OKSALATNE  
UROLITIJAZE PROKSIMALNIH  
BUBREŽNIH TUBULA (MDCK TIP I)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Martina Smolić, dr. med.

Rad ima 37 listova, 6 tablica i 13 slika.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Urolitijaza .....	1
1.2. Vrste i veličina kamenca.....	1
1.2.1. Kalcijaska litijaza .....	1
1.2.2. Oksalatna litijaza .....	2
1.2.3. Urična litijaza.....	2
1.2.4. Cistinska litijaza.....	2
1.2.5. Struvitna („upalna“) litijaza .....	3
1.3. Etiologija.....	3
1.4. Dijagnoza.....	4
1.4.1. Slikovni testovi probira.....	4
1.4.2. Laboratorijska ispitivanja .....	5
1.5. Liječenje.....	5
1.5.1. Invazivne metode.....	6
1.6. Kofein.....	6
1.7. Glutacion (GSH).....	7
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. CILJ</b> .....	<b>10</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>11</b>
4.1. Ustroj studije .....	11
4.2. Materijali.....	11
4.3. Metode .....	11
4.3.1. Protokol za stvaranje kristala kalcijevog oksalata .....	11

4.3.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH).....	13
4.4. Statističke metode.....	14
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>15</b>
5.1. Ispitivanje djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalata i stanične linije MDCK tip I .....	15
5.1.1. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na kristale kalcijevog oksalata (nakon 1 h) .....	16
5.1.2. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na kristale kalcijevog oksalata (nakon 3 h) .....	18
5.1.3. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na kristale kalcijevog oksalata na (nakon 24 h) .....	20
5.1.4. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na stanice linije MDCK tip I.....	22
5.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH).....	23
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>28</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>29</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>30</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>31</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>36</b>

## Popis kratica

MDCK tip I	Epitelne stanice izolirane iz psećeg bubrega (engl. <i>Madin-Darby canine kidney cells type I</i> )
KUB	Bubreg, ureter i mokraćni mjehur (engl. <i>kidney, ureter, and bladder</i> )
CT	Kompjutorizirana tomografija (engl. <i>Computed tomography</i> )
PTH	Paratiroidni hormon
NSAD	Nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. <i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> )
ESWL	Litotripsija ekstrakorporalnih udarnih valova (engl. <i>Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy</i> )
PNL	Perkutana nefrolitotripsija (engl. <i>Percutaneous nephrolithotomy</i> )
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i> )
HPFS	Studija praćenja Udruženja zdravstvenih stručnjaka (engl. <i>The Health Professionals Follow-Up Study</i> )
NHS	Studija zdravstvene skrbi za zdravstvenu skrb (engl. <i>Nurses' Health Study</i> )
GSH	Reducirani glutation (engl. <i>Glutathione</i> )
tGSH	Ukupni glutation (engl. <i>Total glutathione</i> )
GSSG	Oksidirani glutation (engl. <i>Glutathione disulfide</i> )
DMEM	Dulbeccov modificirani Eagle medij (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
FBS	Fetalni goveđi serum (engl. <i>Fetal bovine serum</i> )
NaOH	Natrijev hidroksid
CaOx	Kalcijev oksalat
Tris-HCl	Pufer Tris-HCl (engl. <i>TRIS hydrochloride</i> )
COM	Kalcijev oksalat monohidrat (engl. <i>Calcium oxalate monohydrate</i> )
UV	Ultraljubičasto (engl. <i>Ultraviolet</i> )
DTNB	Ellmanov reagens - 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. <i>Dithionitrobenzoate</i> )
TNB	5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. <i>5-thio-2-nitrobenzoic acid</i> )

NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
PBS	Fosfatom puferirana otopina soli (engl. <i>Phosphate buffered saline</i> )
Aneksin A1	Vezujući protein kristala kalcijevog monohidrata (engl. <i>COM crystal-binding proteins</i> )



## Popis tablica

Tablica 1. Prikaz podataka o broju kristala kalcijevog oksalata u odnosu na rastuću koncentraciju kofeina.....	15
Tablica 2. Prikaz broja kristala kalcijevog oksalata u mediju s kofeinom različitih koncentracija (nakon 1 h).....	18
Tablica 3. Prikaz broja kristala kalcijevog oksalata u mediju s kofeinom različitih koncentracija (nakon 3 h).....	20
Tablica 4. Prikaz broja kristala kalcijevog oksalata u mediju s kofeinom različitih koncentracija (nakon 24 h).....	22
Tablica 5. Prikaz preživljenja MDCK tip I stanica u odnosu na rastuću koncentraciju kofeina i prisutnost kalcijevog oksalata .....	23
Tablica 6. Prikaz odnosa aritmetičke sredine, standardne devijacije i postotka ekspresije tGSH-a na tretiranost stanica kalcijevim oksalatom i kofeinom.....	24

## Popis slika

Slika 1. Strukturna formula kofeina.....	7
Slika 2. Strukturna formula glutationa .....	8
Slika 3. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata.....	15
Slika 4. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 1 sata .....	16
Slika 5. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 1 sata.....	17
Slika 6. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 1 sata.....	17
Slika 7. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 3 sata .....	18
Slika 8. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 3 sata.....	19
Slika 9. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 3 sata.....	19
Slika 10. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 24 sata.....	20
Slika 11. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 24 sata .....	21
Slika 12. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 24 sata.....	21
Slika 13. Prikaz odnosa postotka ekspresije tGSH-a nakon dodanog kalcijevog oksalata i rastuće koncentracije kofeina .....	23

# 1. UVOD

## 1.1. Urolitijaza

Urolitijaza, tj. mokraćna kalkuloza označava prisutnost kamenaca u urinarnom traktu (sabirnim tubulima, čašicama ili nakapnicama bubrega i/ili mokraćnom mjehuru). Predstavlja treću najčešću bolest urinarnog trakta ljudi, nakon infekcija mokraćnog sustava i bolesti prostate. Podatci različitih studija ukazuju da od urolitijaze boluje 5 – 15 % opće svjetske populacije. Sama je bolest češća kod muškaraca, u trećem i četvrtom desetljeću života, u pretilih osoba, kao i kod onih koji konzumiraju više hrane životinjskog podrijetla (1). Postoji genetska predispozicija za obolijevanje s obzirom na to da potomci roditelja s urolitijazom češće i sami obolijevaju. Kemijski proces stvaranja kamenaca odvija se u nekoliko faza i ovisi o litogenim čimbenicima i inhibitorima kristalizacije (2, 3). Važna je zasićenost mokraće, njezin pH, prisutnost inhibitora kristalizacije i mogućnost retencije nastalih kristala. U prezasićenoj mokraći u kojoj je koncentracija soli nadmašila granicu njihove topljivosti, događa se spontana nukleacija kristala. Na takav način potiče se stvaranje budućeg kamenca. Slijedi agregacija (koju sprečavaju inhibitori magnezij, citrat, pirofosfat, peptidi), daljnji rast kristala i konačno nastanak kamenca (4, 5).

## 1.2. Vrste i veličina kamenca

Mokraćni kamenci obično se klasificiraju prema mjestu u bubregu (nefrolitijaza), ureteru (ureterolitijaza) ili mokraćnom mjehuru (cistolitijaza) ili prema kemijskom sastavu (kalcijski, struvitni, kamenci mokraćne kiseline ili drugih spojeva). Veličina kamenca obično se navodi u milimetrima (mm) koristeći jednodimenzionalne ili dvodimenzionalne mjere (6, 7).

### 1.2.1. Kalcijaska litijaza

Oko 80 % svih kamenaca nastalih u mokraćnom sustavu čovjeka čine kalcijski kamenci. Češće se javlja kod muškaraca u dobi od 20 do 30 godina. Uzrokovani su hiperkalcijemijom uslijed hiperparatireoidizma, viška vitamina D i/ili kalcija u prehrani, kao i nuspojava primjene pojedinih diuretika, koštane resorpcija uslijed imobilizacije ili drugih

razloga i hiperkalciurijom većom od 7,5 mmol/24 h urinu, pri čemu se, neovisno o pH, obaraju kalcijski kamenci. U oko 5 % bolesnika s kalcijском litijazom u podlozi je primarni hiperparatireoidizam (2, 8, 9).

### **1.2.2. Oksalatna litijaza**

Oksalatna litijaza rijetko je primarna, a češće sekundarna uz povećanu crijevnu resorpciju oksalata. Kalcij se u crijevu spaja s oksalatom i izlučuje stolicom, no ako se radi o manjku kalcija, povećava se crijevna resorpcija oksalata, koji se tada izlučuje mokraćom i ne kristalizira u prisutnosti magnezija kao inhibitora. Međutim, pri hipersaturaciji i/ili manjku inhibitora slijedi kristalizacija i stvaranje oksalatnih kamenaca (2, 7).

### **1.2.3. Urična litijaza**

Oko 5 – 8 % svih bolesnika s urolitijazom ima kamence građene od mokraćne kiseline, koja nastaje u organizmu kao krajnji razgradni produkt purina. Takva vrsta kamenca češće se javlja kod muškaraca nego kod žena. Pacijenti koji se podvrgavaju kemoterapiji skupina su visokog rizika za razvoj urične litijaze (10). Povećan egzogeni unos nukleoproteina ili pojačano endogeno stvaranje (mijeloproliferacijske bolesti, liječenje citostaticima, antituberkuloticima) urata uz dehidraciju i trajno kiseli pH urina koji smanjuje njihovu topljivost pridonose stvaranju urične litijaze. Često su uratni kamenci prvi znak gihta u bolesnika (8, 11).

### **1.2.4. Cistinska litijaza**

Ona se javlja u bolesnika koji boluju od cistinurije, nasljedne bolesti koja pogađa oba spola. Rijetka je, recesivno nasljedna i na nju otpada 1 – 2 % svih slučajeva. Radi se o nasljednom poremećaju transporta pojedinih aminokiselina među kojima i cistina u proksimalnom bubrežnom tubulu i crijevnoj sluznici. Neresorbirani cistin izlučuje se mokraćom (2, 12).

### 1.2.5. Struvitna („upalna“) litijaza

Obično se formira kod žena koje pate od infekcija mokraćnog sustava. Ta vrsta kamenaca može postati vrlo velika. Događa se u inficiranoj mokraći pod utjecajem urealitičkih bakterija (*Serratia marcescens*, *Providentia spp.*, *Proteus mirabilis*) koje cijepaju ureu na  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  trošeći vodikove ione i alkalizirajući mokraću (7, 10). U alkalnom mediju uspješno rastu odljevni kamenci struvita (magnezij – amonij pirofosfata) izgledom nalik na jelenje rogeve. Kako je infekcija uvijek u podlozi tog tipa litijaze, njezinim se liječenjem prekida zatvoreni krug uzastopnih infekcija, tj. uvjeta za sprječavanje razvoja kamenca (3, 7).

### 1.3. Etiologija

Stvaranje bubrežnih kamenaca (calculogeneza) složen je i multifaktorski proces koji uključuje unutarne kao što su dob, spol i nasljednost i vanjske čimbenike kao što su geografija, klima, prehrana, mineralni sastav i unos vode.

Rizični čimbenici povezani s formiranjem bubrežnih kamenaca:

Životne navike i prehrambeni, tj. nutritivni čimbenici kao što su prekomjerni unos životinjskih bjelančevina i soli te nedostatak kelatnih sredstava poput citratnih, vlaknastih i alkalnih namirnica.

Metabolički poremećaji metabolizma kao što su hiperkalciurija, hipocitratirija, hiperoksalurija, hiperurikozurija i povijest gihta (defektni metabolizam mokraćne kiseline).

Hiperkalcemijski poremećaji: primarni hiperparatireoidizam i drugi poremećaji metabolizma kalcija.

Sastav urina: prekomjerno izlučivanje promotora urinarne kristalizacije i smanjeno izlučivanje inhibitora (nedostatak inhibitora u urinu).

Niska količina urina: neadekvatan unos vode (dehidracija i prezasićena mokraća).

Ponavljajuće infekcije mokraćnog sustava: abnormalnosti pH mokraće i alkalizacije urina bakterijskom ureazom (kao što je *Proteus mirabilis*).

Genetska sklonost, tj. nasljedni poremećaji: obiteljska povijest kamenaca (genetička osjetljivost), genetske monogene bolesti (pojedinačni abnormalni poremećaji gena na autosomima), bubrežna tubularna acidoza.

Anatomske abnormalnosti: čimbenici kao što su defekti, medularni spužvasti bubreg, stenoza uretrelvičnog čvora, dupliciranje pielouretera, policistična bubrežna bolest i bubreg u potkovama.

Klimatske promjene (globalno zatopljenje), zanimanje, zemljopisni uvjeti i sezonske varijacije (više ljeti nego zimi).

Upalna bolest crijeva i druge crijevne malapsorpcije ili pridružena bolesna stanja.

Nepostojanje crijevnih bakterija koje razgrađuju oksalate.

Litogenetski lijekovi: kao što su indinavir (Crixivan), inhibitor proteaze, sulfonamidi (sulfadiazin), urikosurni agensi, koji imaju nisku topljivost i potiču stvaranje kamenaca i ceftriakson (visoka doza dulje vrijeme) (13, 14).

### **1.4. Dijagnoza**

Dijagnoza se temelji na povijesti bolesti pacijenta, kliničkom pregledu i na potrebnim laboratorijskim i slikovnim probirnim testovima. Povijest i klinički pregled postavljaju sumnju na litijazu urologu, a dijagnostički testovi imaju za cilj potvrditi dijagnozu, istražiti funkcionalnost i morfologiju mokraćnog sustava te identificirati potencijalne etiološke čimbenike koji mogu biti uključeni u formiranje kamena. Probni testovi potrebni za ispitivanje urolitijaze podijeljeni su na slikovne i laboratorijske testove (2, 15).

#### **1.4.1. Slikovni testovi probira**

Rendgenski pregled bubrega, uretera i mokraćnog mjehura (engl. *KUB X-ray*) uočava oko 80 – 90 % kamenaca. Međutim, postoje kamenci (poput kamenca mokraćne kiseline) koji nisu vidljivi s KUB rendgenskim zračenjem (engl. *kidney, ureter, and bladder X-ray*).

Ultrazvuk urinarnog trakta pruža informacije o prisutnosti opstrukcije (hidronefroza) i može pratiti kamence koji se nalaze u bubregu ili mokraćnom mjehuru, ali ne i u ureteru.

Intravenska urografija ili pijelografija pokazuje točnu lokaciju kamenca, kao i sve anatomske abnormalnosti koje mogu postojati i predodređuju formiranje kamena. Također je koristan za procjenu funkcionalnosti bubrega i stupanj hidronefroze.

Kompjutorizirana tomografija, tj. CT bez kontrastnog sredstva je u današnje vrijeme selekcijska metoda koja se koristi u većini uroloških centara za istraživanje urolitijaze jer je dijagnostički superiorna intravenskoj urografiji i omogućuje snimanje renalne anatomije u visokoj rezoluciji (16, 17).

### **1.4.2. Laboratorijska ispitivanja**

Opći test urina (analiza urina): U urinu su obično crvene krvne stanice (eritrociti), a ponekad postoje i elementi infekcije mokraćnog sustava.

Biokemijska analiza krvi: Mjerenje ureje, kreatinina, mokraćne kiseline i kalcija u serumu.

Parathormon (PTH): Hormon koji luče paratireoidne žlijezde, mjeri se u slučajevima visokih vrijednosti kalcija jer može postojati prekomjerna funkcija žlijezda koja doprinosi stvaranju kamenca.

24-satno sakupljanje urina: Cilj je utvrditi metaboličko stanje pacijenta radi identificiranja svake potencijalne metaboličke abnormalnosti koja bi mogla biti odgovorna za formiranje kamenca.

Analiza kamenca: Nakon što se kamenac ukloni, analizira se u specijaliziranim laboratorijima kako bi se identificirala vrsta kamenca i poduzele odgovarajuće mjere koje su potrebne za smanjivanje mogućnosti ponovnog pojavljivanja urolitijaze i recidiva (17–19).

### **1.5. Liječenje**

Prvi korak u liječenju predstavlja olakšanje boli. Tijekom faze jake boli (bubrežna kolika), primjenjuju se posebni farmaceutski agensi za oslobađanje pacijenta od boli. Ti agensi dolaze u obliku za injekcije nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAD) koji djeluju kao sredstva za ublažavanje bolova i smanjuju lokalni edem. Ako se bol nastavi, mogu se

primijeniti jači analgetici, kao što su opioidni analgetici (3, 20). Za prevenciju daljnjih napada bubrežnih kolika, oralni NSAD se daje 7 dana te se može primijeniti i inhibitor adrenergičkih receptora (obično se daje muškarcima za hiperplaziju prostate). Hitna intervencija potrebna je samo kod malog broja bolesnika, kad bol i dalje traje unatoč farmaceutskom liječenju, opstrukcija oštećuje bubrežnu funkciju te postoji infekcija mokraćnog sustava s vrućicom (18, 21).

Uklanjanje kamenca ovisi o veličini i položaju u mokraćnom sustavu. Kada je kamenac manji od 1 cm i tretira se farmaceutski, u 70 % slučajeva će se automatski povući samostalno u razdoblju 4 – 6 tjedana. U ostalim slučajevima bit će potrebna invazivna terapija s ciljem fragmentacije i uklanjanja kamenca (11, 22).

### **1.5.1. Invazivne metode**

Litotripsija ekstrakorporalnih udarnih valova (ESWL): Kamenac je razbijen uporabom udarnih valova. Obično ga pacijent dobro podnosi i ima 90 % uspjeha. Međutim, još uvijek postoji kamenje koje se ne može slomiti s ESWL-om.

Ureteroskopija i intrakorporalna litotripsija: Koristi se za uklanjanje kamenaca smještenih u ureteru. Ureteroskop se umetne kroz uretru u ureter dok se ne lokalizira kamen i uklone njegovi fragmenti. Najmodernija je metoda laserska litotripsija (23, 24).

Perkutana nefrolitotripsija (PNL): Primjenjuje se za uklanjanje velikih i/ili gustih bubrežnih kamenaca koji se ne razbijaju s ekstrakorporalnom litotripsijom. Nefroskop se ubacuje kroz kožu u bubreg, lokalizira kamen i razbija ga upotrebom posebnih ultrazvučnih ili balističkih naprava.

Otvorena kirurgija: Danas se koristi samo za vrlo malo odabranih slučajeva (16, 24).

### **1.6. Kofein**

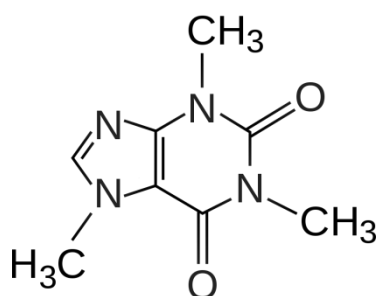
Kofein (1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion (IUPAC), trimetilksantin) je alkaloid ksantina (slika 1.). Nalazi se u listovima, sjemenkama i plodovima biljaka, poput kave, guarane i čaja i također se koristi kao farmakološko sredstvo (25). Najvažniji farmakološki učinak kofeina je stimulans središnjeg živčanog sustava, povećava budnost i stvara uznemirenost. Također



## 1. UVOD

---

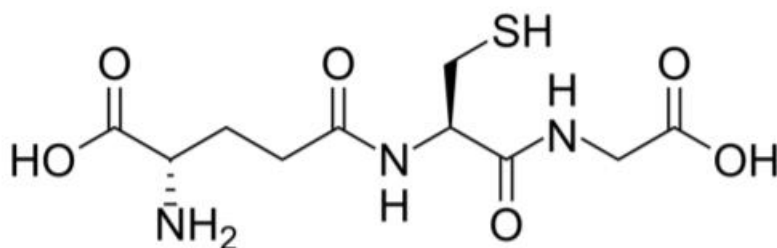
opušta glatku muskulaturu, stimulira srčani mišić, stimulira dijurezu i čini se korisnim u liječenju nekih vrsta glavobolje (26, 27). Uočeno je nekoliko djelovanja kofeina na stanicu, ali nije sasvim jasno kako svako od njih doprinosi njegovom farmakološkom profilu. Među najvažnijima su inhibicija cikličkih nukleotida fosfodiesteraza, antagonizam adenzinskih receptora i modulacija upravljanja unutarstaničnim kalcijem. Kohortne studije pokazale su da je konzumacija kofeinskih pića povezana s nižim rizikom od bolesti bubrežnih kamenaca (28, 29).



Slika 1. Strukturalna formula kofeina

### 1.7. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) je tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutaminske kiseline (slika 2.). Ima ulogu antioksidansa te je prisutan u svim tkivima. Dodatno detoksifikacijsko djelovanje ima zbog svojstva konjugacije s određenim spojevima koje doprinosi njihovoj eliminaciji (30).



Slika 2. Strukturalna formula glutaciona

Sinteza glutaciona u stanicama odvija se posredstvom enzima glutamat-cistein-ligaze čijim se djelovanjem glutamat i cistein spajaju u dipeptid γ-glutamilcistein. Enzim glutation-

## 1. UVOD

---

sintetaza dodaje glicin na nastali dipeptid čime nastaje tripeptid glutation. Povećana proizvodnja glutationa spriječena je mehanizmom negativne povratne sprege (31).

Glutation je prisutan u dva oblika: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Iz njihovog omjera moguće je dobiti podatke o oksidacijskom stanju stanice. Reducirani glutation (GSH) glavni je slobodni tiol u većini stanica živih bića i uključen je u mnoge biološke procese (detoksikacija ksenobiotika i uklanjanje hidroperoksida). Glutation je prisutan unutar stanica uglavnom u reduciranom obliku (90 – 95 % ukupnog glutationa). Oksidacija glutationa dovodi do stvaranja glutation disulfida (GSSG). U većini je stanica omjer GSH-a prema GSSG-u veći od 500 (32).

Unutarstanični GSH status osjetljiv je pokazatelj ukupnog zdravlja stanice i njegove sposobnosti da se odupre toksičnom izazovu (31, 33).

## **2. HIPOTEZA**

Primjena kofeina sprječava nastanak kristalizacije kalcijevog oksalatnog monohidrata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula – MDCK tip I.

## 3. CILJ

Ciljevi su ovog istraživanja utvrditi toksični učinak kalcijevog oksalata u različitom razdoblju izloženosti na epitelnim stanicama proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK tip I. Također, procijeniti učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije kalcijevog oksalata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula te izmjeriti koncentraciju glutationa (GSH) u epitelnim stanicama proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK tip I nakon tretmana kalcijevim oksalatom i kofeinom.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Studija je napravljena u obliku randomiziranog kontroliranog pokusa (33).

#### 4.2. Materijali

Od kemikalija korišten je kalcijev oksalat (Sigma - Aldrich) te kofein (Sigma). Stanična kultura koja se koristila je *Madin - Darby canine kidney cells* podtipa I (MDCK TIP I). Roditeljski MDCK stanični tip izoliran je iz zdravoga, odraslog koker španijela (34). Stanična linija je dar iz laboratorija prof. dr. sc. Carla Verkoelena s Urološke klinike Erasmus medicinskog centra u Rotterdam. Stanice su uzgajane u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (DMEM) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) te 1 %-tne otopine antibiotika/antimikotika (Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA) (35).

#### 4.3. Metode

Sav rad sa stanicama održavan je pod digestorom klase II za rad sa staničnim kulturama s jednosmjernim horizontalnim protokom zraka prema van radi sigurnijih i aseptičnih uvjeta rada, uz korištenje rukavica te sterilizacije površina, korištenog pribora i unošenih predmeta.

##### 4.3.1. Protokol za stvaranje kristala kalcijevog oksalata

Priređen je pufer koji sadrži 10 mM Tris - HCl i 90 mM NaCl pri pH 6,5. Prvo je odvagan Tris - HCl, zatim NaCl te je stavljeno u odmjernu tikvicu. Dodana je destilirana voda i stavljena magnetska pločica za miješanje. Pripremljene su dvije otopine, otopina NaOH i HCl koja je stavljena u menzuru te zatim nadopunjena destiliranom vodom. NaOH zbog svoje lužnatosti koristi se kao pH regulator, a HCl zbog svoje kiselosti također služi pri kontroli pH otopina. Nakon što je priređena otopina i prethodno izvršena kalibracija elektrode, postavljena je elektroda u otopinu u kojoj mjerimo pH. Dodaje se kiselina (HCl) ili baza (NaOH) po potrebi kako bi se postigao željeni pH 6,5. Namještanje i očitavanje pH

#### 4. MATERIJALI I METODE

---

vrijednosti izvršilo se staklenom elektrodom na pH metru HANNA. Mehaničko miješanje omogućeno je magnetskom pločicom za miješanje. Kada je završeno mjerenje, vadi se elektroda iz otopine te nježno uklanja voda osobito oko vrha elektrode. Priređena otopina održava se na 37 °C.

Dodan je CaOx koncentracije 5 mM u bazični pufer Tris – HCl. Napravljene su 8 x i 80 x koncentriranije otopine CaOx i Tris – HCl pufera. Rezultirajuća bijela mutna otopina miješana je na 150 rpm tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi i ostavljena bez drmanja da bi se kristali usporili. Nakon 24 sata centrifugirano na 3000 rpm 5 minuta na centrifugi. Odbačen je supernatant, a kristali sakupljeni. Nadalje, obavljeno je resuspendiranje kristala u metanolu te centrifugirano na 3000 rpm 5 minuta na centrifugi. Metanol je uklonjen te je dekontaminacija odrađena UV zračenjem tijekom 30 minuta prije uporabe.

Za ispitivanje toksičnosti kalcijevog oksalata (koji se prethodno pripremi prema ranije opisanom protokolu), subkultivirane stanice uzgojene su u jednosloju u pločici sa šest jažica. Nakon uzgajanja stanica do pune konfluentnosti, ispran je medij i u svaku je jažicu dodan sljedeći sadržaj: u kontrolnu jažicu stavljen je medij sa stanicama gustoće  $4 \times 10^5$  st/ml, u drugu jažicu stavljen je medij i 8 mM kristali kalcijevog oksalata (kao i u svakoj sljedećoj jažici). U treću jažicu stavljen je medij i kofein 1 mM koncentracije, a u četvrtu jažicu medij, kristali kalcijevog oksalata te kofein u koncentraciji od 0,1 mM (najmanja koncentracija). U petu jažicu stavljen je medij, kristali kalcijevog oksalata te kofein u koncentraciji od 1 mM te u šestu jažicu medij, kristali kalcijevog oksalata i kofein u koncentraciji od 10 mM (najveća koncentracija). Stanice su inkubirane na 37 °C pri 5 % CO<sub>2</sub> te je svjetlosnom mikroskopijom praćen broj kristala nakon 1 sat, 3 sata i 24 sata. Potom su načinjene mikrofotografije inverznim svjetlosnim mikroskopom uz sustav EVOS™ FL Color Imaging Systems (potpuno integrirani, digitalni, inverzni sustav za snimanje za četiri boje fluorescencije i primjene prijenosne svjetlosti).

Drugi je dan sadržaj svake jažice tripsiniziran prema protokolu za tripsinizaciju kao i u ispitivanju toksičnosti te prebačen u tubice kojima je dodan medij, a zatim je određeni volumen prebačen u ependorfice i dodano tripan plavila (engl. *trypan blue*) boje radi bojanja vijabilnih stanica u Neubauerovom hemocitometru pod svjetlosnim mikroskopom i srednjim povećanjem (36–38).

### 4.3.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona (tGSH)

Prvi dan pokusa, stanice MDCK tipa I nasađene su u koncentraciji  $4 \times 10^5$  stanica po mililitru medija u pločicu sa 6 jažica. U jažicu koja predstavlja kontrolu, dodana je srednja vrijednost kofeina, a u svaku slijedeću jažicu dodan je kofein u rastućim koncentracijama (0,1 mM, 1 mM i 10 mM). Istovremeno, dodan je 8 mM kalcijev oksalat u sve jažice osim kontrolne. Stanice su inkubirane preko noći. Drugi dan promijenjen je medij u DMEM-u bez FBS-a. Nakon inkubacije, tj. treći dan pokusa, iz svih je jažica uklonjen medij, isprane su PBS-om te su odlijepljene od površine uz pomoć gumene *cell scraper* za stanične kulture.

Preživljenje stanica određeno je ekskluzijskim testom *Trypan Blue* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) bojom u suspenziji uz pomoću Neubauerovog hemocitometra pod svjetlosnim mikroskopom i srednjim povećanjem. Svi rezultati izraženi su u odnosu na kontrolnu skupinu koja je uzgajana isključivo u DMEM-u.

Koncentracija ukupnog glutaciona (tGSH) izmjerena je spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog kita (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD), prema protokolu proizvođača. Biološki je uzorak najprije centrifugiran na 600 xg kako bi se dobio pelet stanica na dnu tubice, uklonjen je supernatant te je dodana 5 % 5-sulfosalicilna kiselina, a stanice su vorteksirane. Potom su stanice zamrznute i odmrznute dva puta te su centrifugirane na 10000 xg 10 minuta. Supernatant je uklonjen i korišten za mjerenje koncentracije GSH-a (39).

Mjerenje GSH-a koristi kinetičko ispitivanje u kojem katalitičke količine (nmol) GSH-a uzrokuju kontinuiranu redukciju DTNB-a (Ellmanov reagens) na TNB i formirani GSSG reducira se pod utjecajem glutation reduktaze i NADPH-a. Reakcija za mjerenje koncentracije GSH-a postavljena je u pločici s 96 jažica. Mjerenje GSH-a odrađeno je prema Sigma Aldrich protokolu (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD), inkubirano je tijekom 5 minuta te je dodana otopina NADPH-a multikanalnom pipetom. Reakcija je izmjerena pomoću iMark™ Microplate Absorbance Reader (žuti produkt, 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB)) na valnoj duljini 412 nm s kinetičkim programom čitanja svake minute tijekom 5 minuta (33).

Dobiveni rezultati prikazani su kao postotak u odnosu na kontrolu, tj. u odnosu na rezultate netretiranih stanica.

### **4.4. Statističke metode**

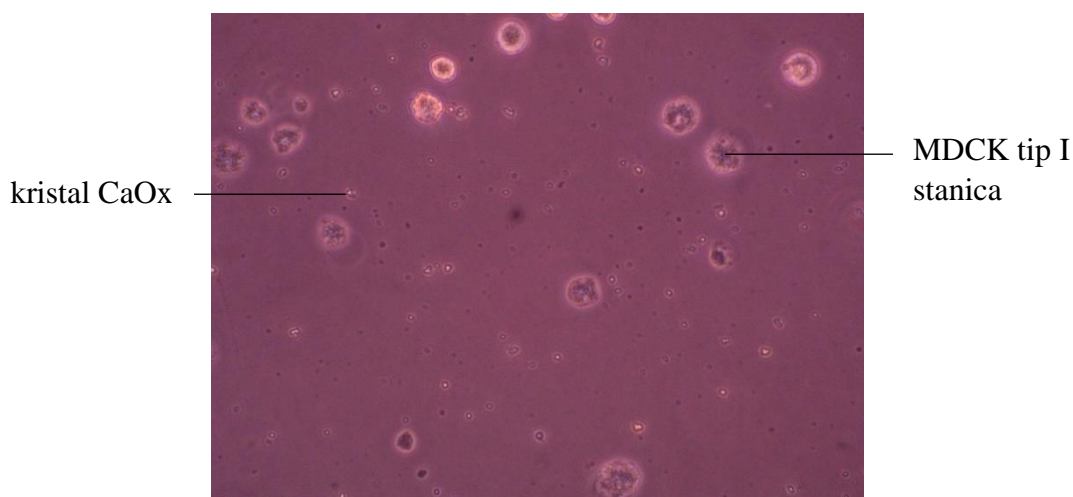
Dobiveni i prebrojani numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom te su dalje analizirani prema svome značenju. Radi manjka usporednih skupina u dobivenim rezultatima, statistički testovi usporedbe nisu bili primjenjivi (40).



## 5. REZULTATI

### 5.1. Ispitivanje djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalata i stanične linije MDCK tip I

Stanice linije MDCK tip I tretirane su jednakim količinama kristala kalcijevog oksalata te kofeinom u rastućim koncentracijama. Rezultati jažice koja je sadržavala samo medij (slijepa proba) te rezultati jažice koja se sastojala samo od medija i kofeina u prikazu rezultata su izostavljeni jer ne sadrže kristale kalcijevog oksalata. Nadalje, jažica koja se sastojala od medija i kristala kalcijevog oksalata je prikazana na slici 3. Tablica 1. prikazuje broj kristala kalcijevog oksalata nakon 1 h, 3 h i 24 h.



Slika 3. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata

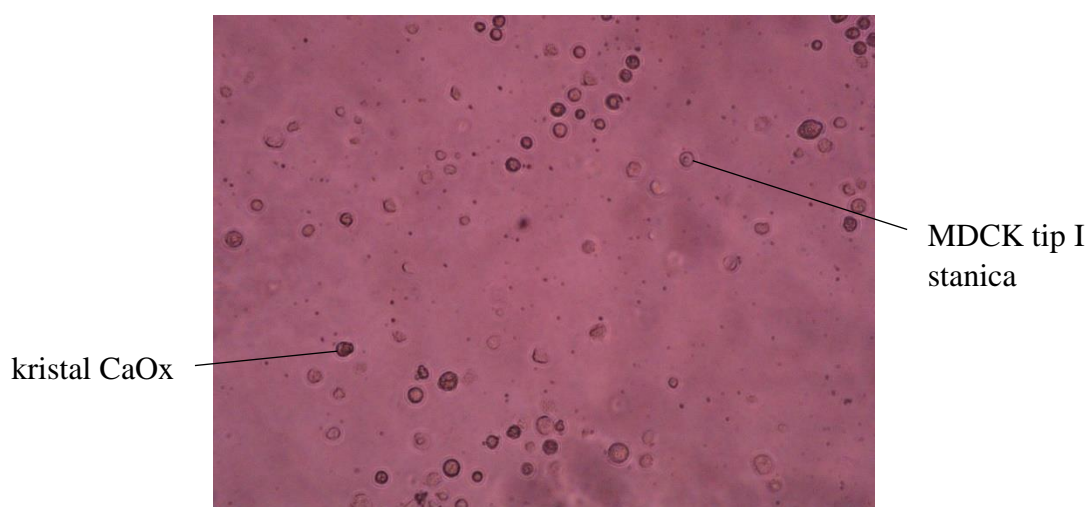
Tablica 1. Prikaz podataka o broju kristala kalcijevog oksalata u odnosu na rastuću koncentraciju kofeina <sup>a</sup>

Stanice tretirane CaOx	Broj kristala CaOx		
	1 h	3 h	24 h
Stanice tretirane CaOx	325 (1)	290 (3)	123 (24)
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)	303 (1)	275 (3)	115 (24)
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)	267 (1)	129 (3)	104 (24)
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)	58 (1)	57 (3)	50 (24)

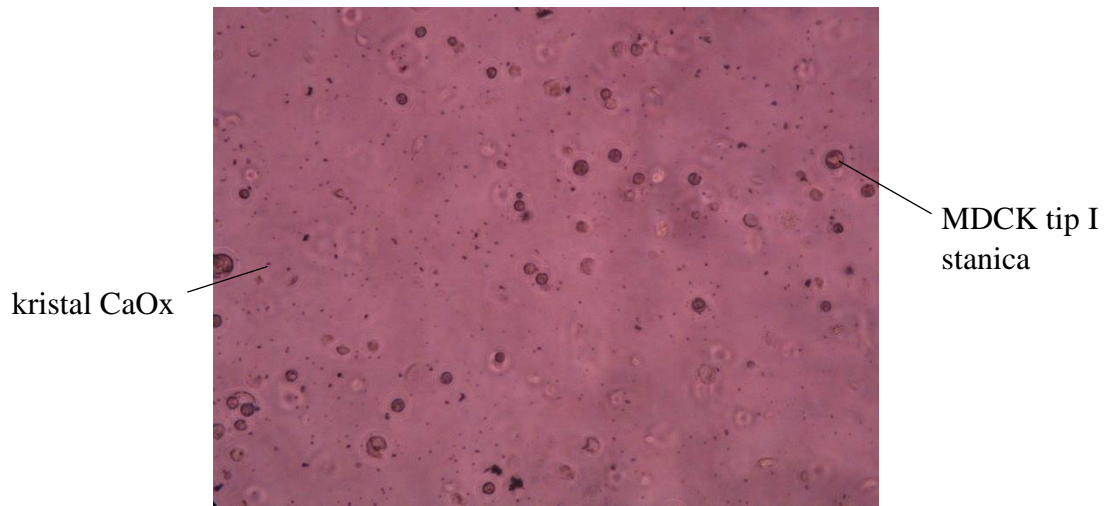
<sup>a</sup> vrijeme inkubacije (h) prikazano je u zagradama

### 5.1.1. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na kristale kalcijevog oksalata (nakon 1 h)

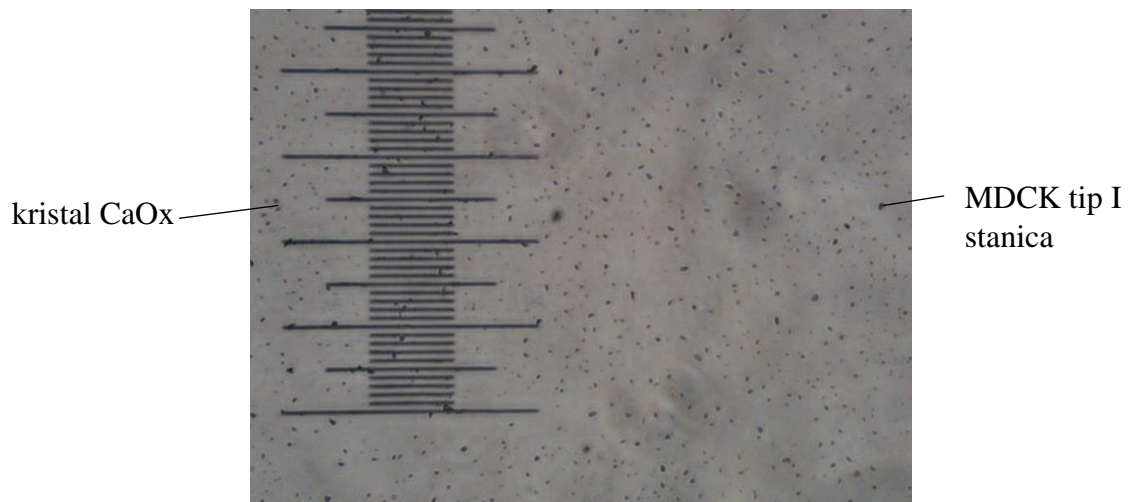
Nakon jednog sata inkubacije stanica testiranih u sklopu određivanja utjecaja kofeina na kristale kalcijevog oksalata, gdje su stanice bile izložene jednakim količinama kristala kalcijevog oksalata i rastućim koncentracijama kofeina, izbrojan je smanjen broj kristala u jažicama (slika 4., 5. i 6.) koji je korelirao s povećanjem koncentracije dodanog kofeina (tablica 2.).



*Slika 4. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 1 sata*



*Slika 5. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 1 sata*



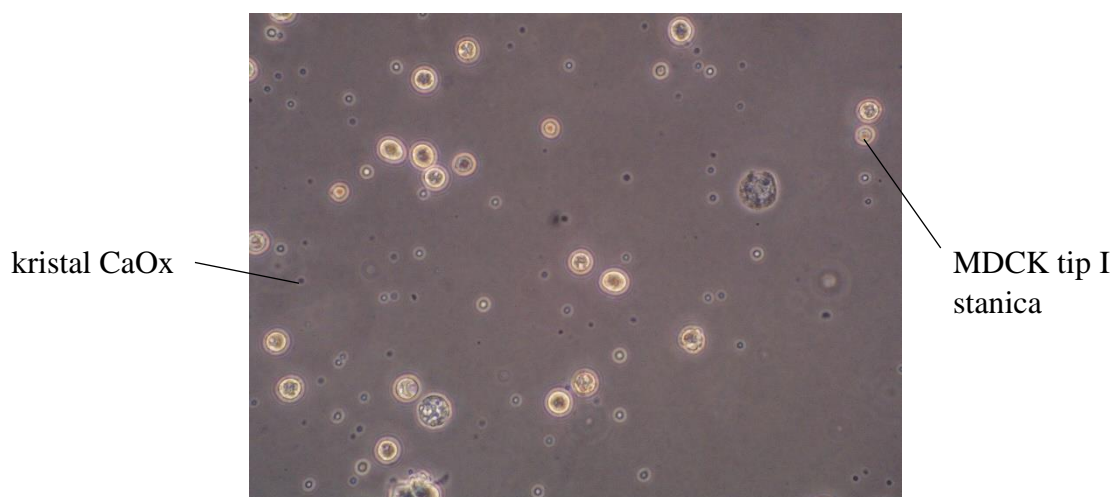
*Slika 6. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 1 sata*

Tablica 2. Prikaz broja kristala kalcijevog oksalata u mediju s kofeinom različitih koncentracija (nakon 1 h)

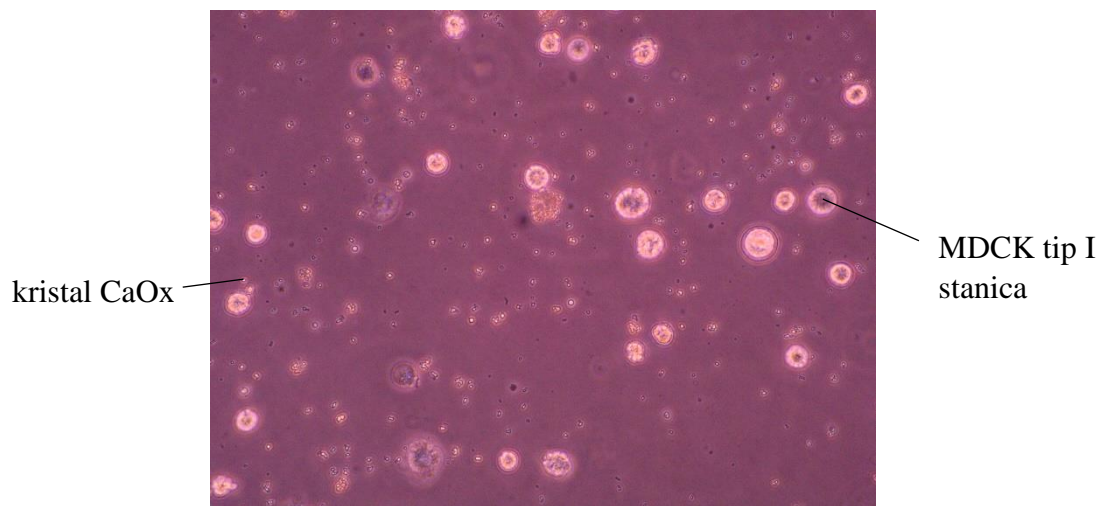
	Broj kristala CaOx
Stanice tretirane CaOx	325
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)	303
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)	267
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)	58

### 5.1.2. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na kristale kalcijevog oksalata (nakon 3 h)

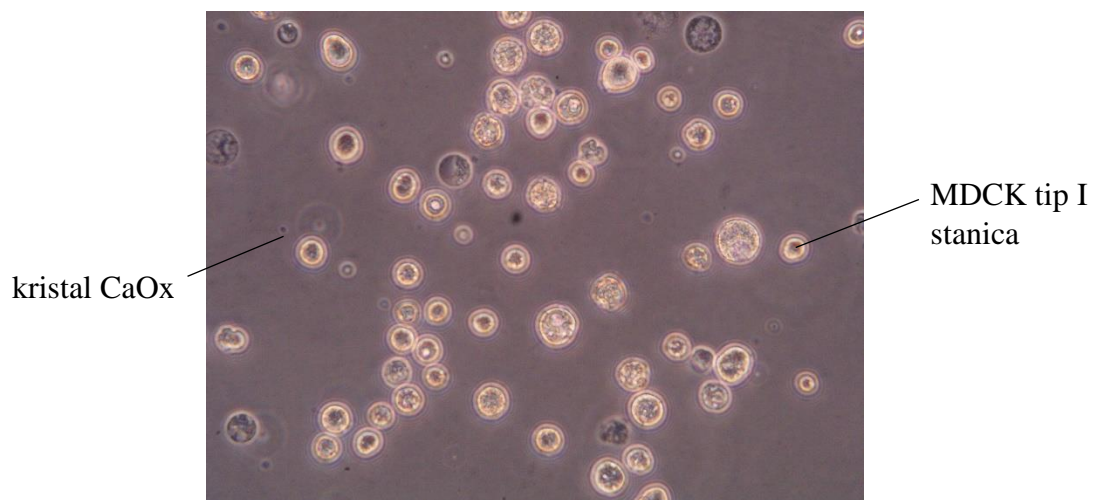
Nakon tri sata inkubacije stanica tretiranih jednakim količinama kristala kalcijevog oksalata s rastućim koncentracijama kofeina, izbrojano je znatno smanjenje broja kristala u jažicama u odnosu na broj kristala nakon jednosatne inkubacije (slika 7., 8. i 9.). Broj izbrojanih kristala odgovara povećanju koncentracije dodanog kofeina te vremenu inkubacije (tablica 3.).



Slika 7. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 3 sata



*Slika 8. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 3 sata*



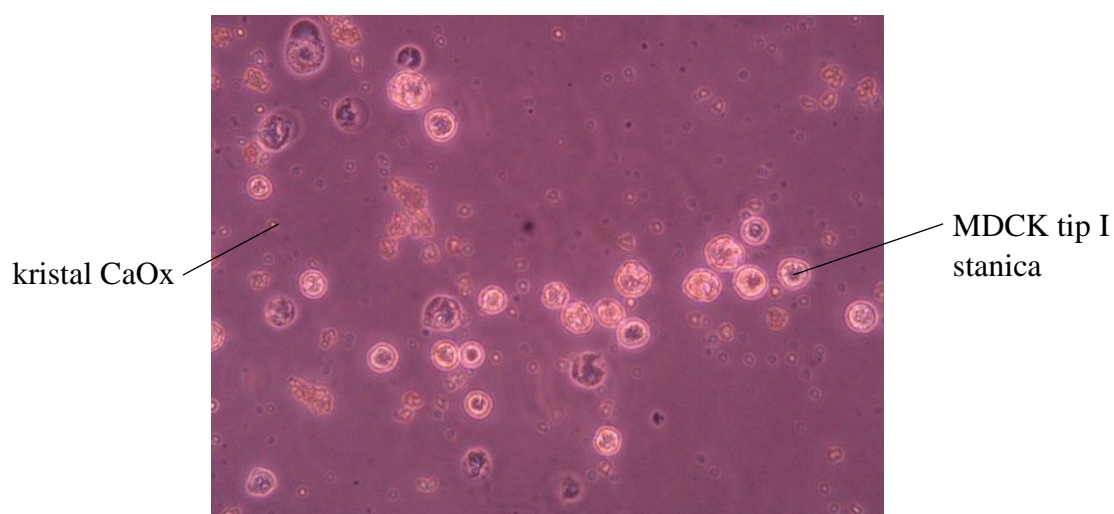
*Slika 9. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 3 sata*

Tablica 3. Prikaz broja kristala kalcijevog oksalata u mediju s kofeinom različitih koncentracija (nakon 3 h)

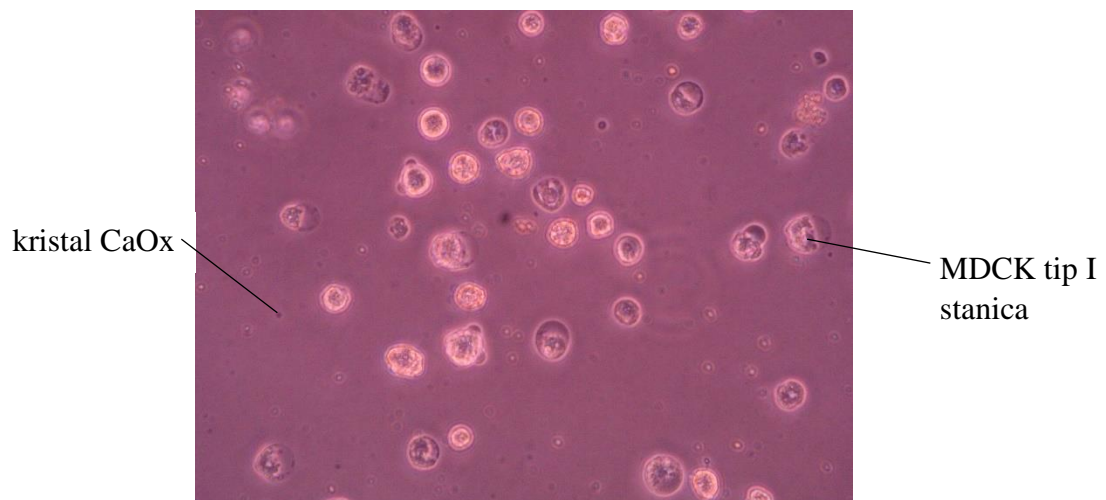
	Broj kristala CaOx
Stanice tretirane CaOx	290
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)	275
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)	129
Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)	57

### 5.1.3. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na kristale kalcijevog oksalata (nakon 24 h)

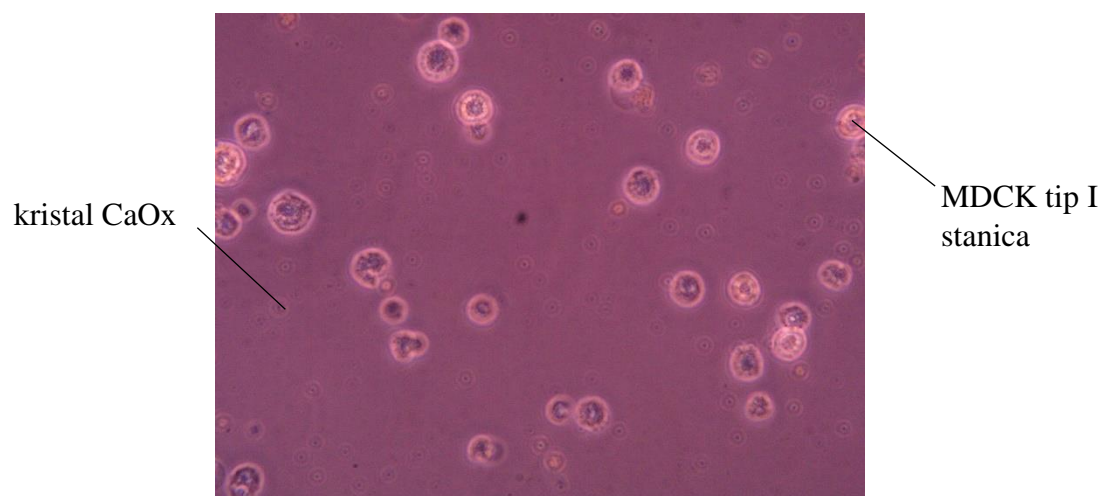
Najveća razlika u broju kristala kalcijevog oksalata u jažicama sa stanicama tretiranim jednakim količinama kristala kalcijevog oksalata s rastućim koncentracijama kofeina vidljiva je nakon 24-satne inkubacije. Izbrojan je smanjen broj kristala u jažicama u odnosu na broj kristala nakon jednosatne i trosatne inkubacije (slika 10., 11. i 12.). U tablici 4. je prikazano značajno smanjenje broja kristala kalcijevog oksalata proporcionalno s povećanjem koncentracije kofeina te vremenom inkubacije.



Slika 10. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 24 sata



*Slika 11. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 24 sata*



*Slika 12. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 24 sata*

*Tablica 4. Prikaz broja kristala kalcijevog oksalata u mediju s kofeinom različitih koncentracija (nakon 24 h)*

	<b>Broj kristala CaOx</b>
<b>Stanice tretirane CaOx</b>	123
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)</b>	115
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)</b>	104
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)</b>	50

#### **5.1.4. Djelovanje kofeina u rastućim koncentracijama na stanice linije MDCK tip**

##### **I**

U ispitivanju utjecaja kofeina na epitelne stanice proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK tip I, stanice su izložene kalcijevom oksalatu te kofeinu u rastućim koncentracijama. Jažica u kojoj se nalazio samo medij i kristali kalcijevog oksalata te jažica koja je sadržavala medij i kofein u određenoj koncentraciji (srednja vrijednost) su izostavljene iz prikaza rezultata zbog isključenosti istovremenog utjecaja kofeina i kalcijevog oksalata na stanice.

Nakon kraja 1-satne, 3-satne i 24-satne inkubacije te daljnje obrade stanica u jažicama, sadržaj svake jažice prebačen je u Neubauerov hemocitometar te su uz pomoć njega prebrojane vijabilne stanice pod svjetlosnim mikroskopom (srednje povećanje). Broj vijabilnih stanica u jažicama korelirao je s povećanjem koncentracije dodanog kofeina. Najveći broj uočen je u jažicama s najvećom koncentracijom dodanog kofeina u svim mjerenjima. Rezultati su prikazani u tablici 5.



## 5. REZULTATI

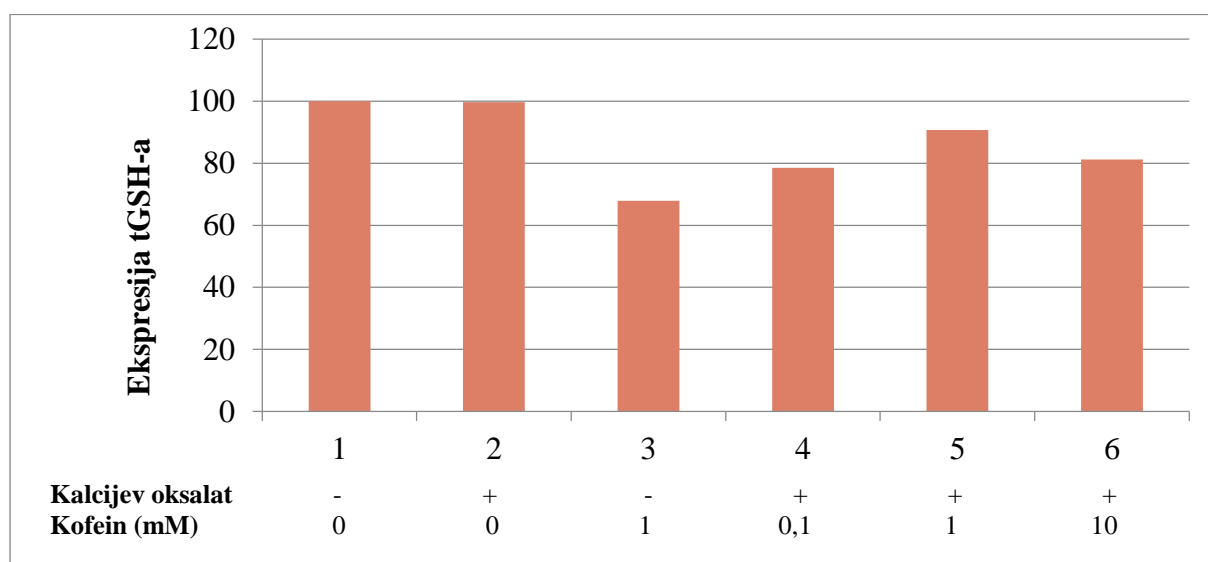
Tablica 5. Prikaz podataka o koncentraciji vijabilnih stanica MDCK tip I u odnosu na rastuću koncentraciju kofeina i prisutnost kalcijevog oksalata <sup>a</sup>

	Broj stanica / ml		
	<b>Netretirane stanice</b>	12,5 x 10 <sup>5</sup> (1)	12,0 x 10 <sup>5</sup> (3)
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)</b>	5,1 x 10 <sup>5</sup> (1)	5,3 x 10 <sup>5</sup> (3)	5,0 x 10 <sup>5</sup> (24)
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)</b>	5,3 x 10 <sup>5</sup> (1)	5,0 x 10 <sup>5</sup> (3)	5,0 x 10 <sup>5</sup> (24)
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)</b>	7,5 x 10 <sup>5</sup> (1)	7,0 x 10 <sup>5</sup> (3)	7,0 x 10 <sup>5</sup> (24)

<sup>a</sup> vrijeme inkubacije (h) prikazano je u zagradama

### 5.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH)

Mjerenjem ekspresije tGSH-a na tretiranim stanicama, dobiveni rezultati ukazali su na veći postotak izraženog ukupnog glutationa u stanicama tretiranim kofeinom uz dodatak kalcijevog oksalata (78,53 – 90,73 %), nego u stanicama tretiranim isključivo kofeinom, bez dodatka kalcijevog oksalata (67,92 %), a manje od u potpunosti netretiranih stanica, gdje je postotak izražaja potpun (100 %) te od stanica tretiranih samo kalcijevim oksalatom (99,69 %). Rezultati su prikazani na slici 13. i tablici 6.



Slika 13. Prikaz odnosa postotka ekspresije tGSH-a nakon dodanog kalcijevog oksalata i rastuće koncentracije kofeina

## 5. REZULTATI

Tablica 6. Prikaz odnosa aritmetičke sredine, standardne devijacije i postotka ekspresije tGSH-a na tretiranost stanica kalcijevim oksalatom i kofeinom

	<b>Aritmetička sredina</b>	<b>Standardna devijacija</b>	<b>Ekspresija tGSH-a / netretirane stanice (%)</b>
<b>Netretirane stanice</b>	0,3884	0,0002121	100
<b>Stanice tretirane CaOx</b>	0,3872	0,001485	99,69
<b>Stanice tretirane kofeinom (1 mM)</b>	0,2638	0,003967	67,92
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)</b>	0,3050	0,000636	78,53
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)</b>	0,3524	0,000141	90,73
<b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)</b>	0,3153	0,002687	81,18

### 6. RASPRAVA

Liječenje simptomatskih bubrežnih kamenaca evoluiralo je od otvorene kirurške litotomije do minimalno invazivnih endouroloških tretmana, što je dovelo do smanjenja morbiditeta bolesnika i bolje kvalitete života. Prevencija recidiva zahtijeva intervencije u ponašanju i prehrani, kao i farmakološke tretmane koji su specifični za vrstu kamenca. Postoji velika potreba za prevencijom recidiva koja zahtijeva bolje razumijevanje mehanizama uključenih u formiranje kamenca kako bi se olakšalo razvijanje učinkovitijih lijekova (41, 42).

Učinci kofeina na bubreg istraženi su u brojnim istraživanjima (43–45). Kako se kofein uobičajeno i svakodnevno konzumira širom svijeta, to može biti preventivna strategija smanjenja pojave novih i rekurentnih bubrežnih kamenaca u budućnosti. Iako je otkrivena jaka povezanost između unosa kofeina i smanjenja pojave bubrežnih kamenaca, zaštitni mehanizmi ostali su nepoznati i nisu bili prethodno istraženi (46).

U našem istraživanju uočeno je proporcionalno smanjenje broja kristala kalcijevog oksalata s porastom dodane koncentracije kofeina kao što prikazuju i istraživanja Ferrara i sur. u studiji gdje je pronađena značajna povezanost između unosa kofeina i rizika od nastanka bubrežnih kamenaca u sve tri kohortne studije, tj. grupa za praćenje zdravstvenih stručnjaka (HPFS) i studija zdravstvene skrbi (NHS I i II). S ukupno 200 000 sudionika otkriveno je da je konzumacija pića u kojima je prisutan kofein povezana s 26 – 31 % nižim rizikom od bolesti bubrežnih kamenaca. Osim toga, kava bez kofeina, koja je sadržavala znatno manju količinu kofeina u kavi (do 8,4 %), također bi mogla smanjiti incidenciju bolesti bubrežnih kamenaca, ali s nižim stupnjem (za 16 %) (46–48).

Analiza povezanosti između unosa kofeina i nastanka kamenaca u podskupini sudionika s niskim ili nikakvim unosom kofeina, pokazuje da je, barem u jednoj od triju analiziranih skupina, inverzna povezanost još uvijek značajna. U prethodnim istraživanjima uočen je manji rizik od nastanka bubrežnih kamenaca za napitke s kofeinom (kava i čaj), kao i za kavu bez kofeina (47). Sveukupno, ovi rezultati ukazuju na to da povezanost može biti uzrokovana kofeinom, kao i drugim komponentama tih napitaka, za koje se, na primjer, pokazalo da imaju antioksidativna i protuupalna svojstva. Kava, na primjer, bogata je magnezijem, što bi moglo smanjiti rizik od nastanka kamenca, ali dokaz za povezanost unosa magnezija i rizik od nastanka kamenaca kontroverzan je i ranije nije uočena značajna povezanost između unosa magnezija i rizika od nastanka kamenaca u tim kohortama (28, 49).

Veliki broj sudionika omogućio je da se ispita povezanost uzoraka s niskim ili nikakvim unosom kave, što omogućuje uvid u procjenu povezanosti između kofeina i rizika od nastanka kamenaca neovisan o drugim potencijalno aktivnim tvarima prisutnim u kavi (46, 50).

Također, istraživanje je imalo ograničenja. Sastav kamenaca ispitivane populacije pretežno je bio kalcijev oksalat. Kao i za sve opservacijske studije, analiza se ne može baviti utjecajem na rizik od promjene udjela kofeina u samom kamencu. Nadalje, jer su uključeni samo sudionici bez povijesti bubrežnih kamenaca, rezultati se možda ne odnose na ponavljajuće formiranje kamenaca, iako bi moglo biti razumno očekivati slične povoljne promjene u sastavu urina za tvorbu kamenca. Budući da se kofein obično i dnevno konzumira širom svijeta, možda je preventivna strategija izbora da ubuduće ublaži novu i ponavljajuću incidenciju bubrežnih kamenaca. Naposljetku, viši unos kofeina neovisno je povezan s manjim rizikom od nastanka bubrežnih kamenaca (28, 50).

Iz navedenog može se zaključiti da kofein ima potencijalno zaštitno i povoljno djelovanje na tkivo bubrežnih proksimalnih tubula uslijed povećane količine kalcija i kalcijevog oksalata (51). Studija Peerapen i sur. dodatno dokazuje da kofein može smanjiti intracelularno skladištenje kalcija povećanjem izlučivanja kalcija, što rezultira translokacijom aneksina A1 iz apikalne membrane u citoplazmu i konačno smanjenje sposobnosti vezanja kristala COM renalnih tubularnih epitelnih stanica. Navedeni *in vitro* podatci mogu djelomice objasniti povezanost konzumacije kofeinskih napitaka s manjim rizikom od stvaranja bubrežnih kamenaca, što može dovesti do razvoja zaštitnih strategija za sprječavanje bolesti bubrežnih kamenaca i njihovo ponavljanje (46).

Nadalje, glutation (GSH) je ključni antioksidans koji također modulira različite stanične procese. U radu Tomislava Kizivata i sur. praćen je utjecaj antioksidansa L-arginina na vijabilnost i razinu oksidativnog oštećenja te je provedena procjena oksidativnog oštećenja stanica određivanjem koncentracije glutaciona (GSH) u stanicama. Ispitivanje je provedeno pred-tretmanom stanica s trima različitim koncentracijama L-arginina te je također pokazano kako porast koncentracije L-arginina i vitamina E smanjuje razinu naknadno uzrokovanog oksidativnog oštećenja mjerenu po razini ekspresije superoksid dismutaze (SOD), osteopontina te koncentracije glutaciona kao i kod ovog istraživanja (39). Nadalje, vođeni navedenim radom, u ovom istraživanju ulogu antioksidansa imao je kofein te je pokazano da su stanične kulture s većom količinom dodanog kofeina doživjele smanjeno oksidativno

oštećenje i formiranje kristala dodanog kalcijevog oksalata. Ekspresija ukupnog glutationa (tGSH) povećana je u uzorcima stanica koje su bile tretirane kofeinom proporcionalno s njegovom koncentracijom, ukazujući time na postojeće pozitivno antioksidativno djelovanje uslijed primjene kofeina. U skladu sa svime, dokazano je da je unutarstanični GSH status osjetljiv pokazatelj ukupnog zdravlja stanice i njegove sposobnosti da se odupre toksičnom izazovu.

Također, ovo istraživanje trebalo bi se nastaviti s ciljem razvoja farmakološki kompletnog lijeka. Moguć je razvitak novih specifičnih terapijskih opcija kofeinom u prevenciji nastanka urolitijaze. Međutim, patofiziološki mehanizmi urolitijaze složeni su, uglavnom zato što predstavlja poligeniski poremećaj. Dijetetski agensi igraju bitnu ulogu u stvaranju mokraćnog kamenca, a promjena prehrane može smanjiti rizik od ponovne pojave kamenca. Samom edukacijom pacijenata, praksom zdravog načina života i prevencijom te ranom dijagnozom moguće je smanjiti učestalost obolijevanja.

### 7. ZAKLJUČAK

S ciljem provedenog istraživanja primjene kofeina u sprječavanju nastanka kristalizacije kalcijevog oksalatnog monohidrata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula – MDCK tip I i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Kalcijev oksalat ima sposobnost uzrokovanja oksidativnog oštećenja s posljedičnim odumiranjem stanica linije MDCK tip I
- Kofein ima potencijalnu sposobnost protektivnog učinka s posljedičnim povećanjem vijabilnosti stanica proporcionalnim s porastom primijenjene koncentracije kofeina
- Glutation je pokazatelj zaštitnog djelovanja kofeina na stanice proksimalnih bubrežnih tubula tretiranih kalcijevim oksalatom i kofeinom na način da prisutnom ekspresijom pokazuje smanjenje oksidativnog opterećenja stanica.

### 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Utvrditi toksični učinak kalcijevog oksalata u različitom razdoblju izloženosti na epitelnim stanicama proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK tip I. Nadalje, procijeniti učinkovitost kofeina u sprječavanju nastanka kristalizacije kalcijevog oksalata u staničnom modelu urolitijaze te izmjeriti koncentraciju glutaciona u epitelnim stanicama proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa MDCK tip I nakon tretmana kalcijevim oksalatom i kofeinom.

**Nacrt studije:** Stručna istraživačka studija.

**Materijali i metode:** Od kemikalija korišten je kalcijev oksalat (Sigma - Aldrich) te kofein (Sigma). Korištena stanična kultura je *Madin - Darby canine kidney cells* podtipa I (MDCK tip I). Stanice uzgojene u jednosloju u pločici sa šest jažica te inkubirane do pune konfluentnosti su tretirane kalcijevim oksalatom i kofeinom u odgovarajućim koncentracijama. Svjetlosnom mikroskopijom praćen je nastanak kristalizacije nakon 1 sata, 3 sata te nakon 24 sata. Koncentracija ukupnog glutaciona izmjerena je spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog kita prema protokolu proizvođača. Preživljenje stanica određeno je ekskluzijskim testom Trypan Blue bojom u suspenziji uz pomoć Neubauerovog hemocitometra pod svjetlosnim mikroskopom.

**Rezultati:** Nakon inkubiranja stanica s kristalima kalcijevog oksalata u različitim koncentracijama kofeina pokazano je kako kofein uzrokuje značajno smanjenje broja kristala kalcijevog oksalata te značajno povećanje vijabilnosti stanica proporcionalno s povećanjem njegove koncentracije. Nadalje, izmjerene koncentracije ukupnog glutaciona pokazale su smanjenje oksidativnog opterećenja stanica tretiranih s kofeinom i kalcijevim oksalatom u odnosu na stanice tretirane samo kalcijevim oksalatom.

**Zaključak:** Dokazan je protektivni učinak kofeina na MDCK tip I stanice izložene toksičnom djelovanju kristala kalcijevog oksalata. Također, rezultati sugeriraju da je kofein potencijalni antioksidans u sprječavanju oksidativnog oštećenja stanica.

**Ključne riječi:** glutacion; kalcijev oksalat; kofein; MDCK tip I; urolitijaza

### 9. SUMMARY

**Objectives:** The aim of this study was to determine the toxicity of calcium oxalate at different periods of exposure to epithelial cells of proximal renal cell types MDCK type I. Furthermore, to evaluate the effectiveness of caffeine in the formation of calcium oxide crystallization in the urolithiasis cellular model and measure the glutathione concentration in epithelial cells of proximal MDCK type I cell carcinoma tubes after treatment with calcium oxalate and caffeine.

**Study design:** Laboratory research study.

**Materials and methods:** Chemicals used included calcium oxalate (Sigma - Aldrich) and caffeine (Sigma). The cell culture used in the study was Madin - Darby's canine kidney cells subtype I (MDCK type I). Cells incubated to full confluence were treated with calcium oxalate and caffeine at appropriate concentrations and incubated at 37°C at 5% CO<sub>2</sub> and light microscopy followed the formation of crystallization after 1 hour, 3 hours, and after 24 hours. The concentration of total glutathione (tGSH) was measured by spectrophotometry using a commercially available kit (Glutathione Assay Kit, Sigma - Aldrich, Saint Louis, MO, USA), according to the manufacturer's protocol. Cell survival was determined by the exclusive Trypan Blue (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) suspension dye using Neubauer's hemocytometer under a light microscope.

**Results:** After incubating cells with calcium oxalate crystals at various caffeine concentrations, caffeine has been shown to cause a significant reduction in the number of crystalline calcium oxalate and significantly increase cell viability proportionally to increased concentrations. Furthermore, measured total glutathione concentrations showed a decrease in the oxidative load of the treated cells with caffeine and calcium oxalate compared to the cells treated only with calcium oxalate.

**Conclusion:** The protective effect of caffeine on MDCK type I cells has been shown to be toxic to the action of calcium oxalate crystals. Caffeine represents potential therapy in the treatment of urolithiasis, i.e. a preventative substance for the production of kidney stones. Also, the results suggest that caffeine is a potential antioxidant in the prevention of oxidative cell damage.

**Key words:** caffeine; calcium oxalate; glutathione; MDCK type I; urolithiasis



## 10. LITERATURA

1. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet*. 2006;367(9507):333–44.
2. Langston C, Gisselman K, Palma D, Mccue J. Diagnosis of Urolithiasis. *Compendium*. 2008;(1):447-55.
3. Miller NL, Lingeman JE. Management of kidney stones. *BMJ*. 2007;334(7591):468–72.
4. Costa-Bauza A, Grases F, Calvó P, Rodriguez A, Prieto R. Effect of Consumption of Cocoa-Derived Products on Uric Acid Crystallization in Urine of Healthy Volunteers. *Nutrients*. 2018;10(10):1516.
5. Bilić-Curčić I, Milas-Ahić J, Smolić M, Smolić R, Mihaljević I, Tucak-Zorić S. Urolithiasis and osteoporosis: clinical relevance and therapeutic implications. *Coll Antropol*. 2009;33 Suppl 2:189–92.
6. Pearle MS, Goldfarb DS, Assimos DG, Curhan G, Denu-Ciocca CJ, Matlaga BR, et al. Medical management of kidney stones: AUA guideline. *J Urol*. 2014;192(2):316–24.
7. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis: an update. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008;5(2):101-6.
8. Dawson CH, Tomson CRV. Kidney stone disease: pathophysiology, investigation and medical treatment. *Clin Med (Northfield Il)*. 2012;12(5):467–71.
9. Worcester EM, Coe FL. Calcium Kidney Stones. *N Engl J Med*. 2010;363(10):954–63.
10. Gambaro G, Fabris A, Puliatta D, Lupo A. Lithiasis in cystic kidney disease and malformations of the urinary tract. *Urol Res*. 2006;34(2):102–7.
11. Frassetto L, Kohlstadt I. Treatment and prevention of kidney stones: An Update. *Am Fam Physician*. 2011;84(11):1234-42.
12. Hyams ES, Matlaga BR. Economic impact of urinary stones. *Transl Androl Urol*. 2014;3(3):278–83.
13. Alelign T, Petros B. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. *Adv*

- Urol. 2018;2018:1–12.
14. Sayer JA. The Genetics of Nephrolithiasis. *Nephron Exp Nephrol.* 2008;110(2):e37–43.
  15. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Soldati L. Genetics and calcium nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2011;80(6):587-93.
  16. Morgan MSC, Pearle MS. Medical management of renal stones. *BMJ.* 2016;352:i52.
  17. Portis AJ, Sundaram CP. Diagnosis and initial management of kidney stones. *American Family Physician.* 2001;63(7):1329-38.
  18. Han H, Segal AM, Seifter JL, Dwyer JT. Nutritional Management of Kidney Stones (Nephrolithiasis). *Clin Nutr Res.* 2015;4(3):137.
  19. Pietrow PK, Karellas ME. Medical management of common urinary calculi. *American Family Physician.* 2006;74(1):86-94.
  20. McAninch JW, Lue TF. *Smith & Tanagho's General Urology.* McGraw-Hill. 2013:36-37.
  21. Courbebaisse M, Prot-Bertoye C, Bertocchio J-P, Baron S, Maruani G, Briand S, et al. [Nephrolithiasis of adult: From mechanisms to preventive medical treatment]. *La Rev Med interne.* 2017;38(1):44–52.
  22. Gambaro G, Croppi E, Coe F, Lingeman J, Moe O, Worcester E, et al. Metabolic diagnosis and medical prevention of calcium nephrolithiasis and its systemic manifestations: a consensus statement. *J Nephrol.* 2016;29(6):715–34.
  23. Sultan-Bichat N, Menard J, Perceau G, Staerman F, Bernard P, Reguia Z. Treatment of calcinosis cutis by extracorporeal shock-wave lithotripsy. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(3):424–9.
  24. Srisubat A, Potisat S, Lojanapiwat B, Setthawong V, Laopaiboon M. Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) versus percutaneous nephrolithotomy (PCNL) or retrograde intrarenal surgery (RIRS) for kidney stones. *Cochrane database Syst Rev.* 2009;(4):CD007044.
  25. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory

25. matters. *J Food Sci.* 2010;75(3):R77-87.
26. Mottram DR. *Drugs in Sport*. *Drugs in Sport, Seventh Edition*. Seventh edition. | Milton Park, Abingdon ; New York, NY : Routledge, 2018.: Routledge; 2018.
27. McCusker RR, Fuehrlein B, Goldberger BA, Gold MS, Cone EJ. Caffeine Content of Decaffeinated Coffee. *J Anal Toxicol.* 2006;30(8):611–3.
28. Mejia EG de, Ramirez-Mares MV. Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(10):489–92.
29. Itoh Y, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. *J Urol.* 2005;173(1):271–5.
30. Nollet L, Toldrá F. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*. CRC Press; 2012.
31. Armstrong RN, Morgenstern R, Board PG. Glutathione Transferases. In: *Comprehensive Toxicology*. Elsevier; 2018. p. 326–62.
32. Gomez LD. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J Exp Bot.* 2004;55(404):1851–9.
33. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(5):3143–53.
34. Gauth CR, Hard WL, Smith TF. Characterization of an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK). *Exp Biol Med.* 2000;122(3):931–5.
35. Thermo Fisher Scientific. Guidelines for Maintaining Cultured Cells. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/maintaining-cultured-cells.html>. Datum pristupa: 20.02.2019.
36. Baird TT. Trypsin. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2013. p. 216–9.
37. Ito M, Houkin K. Cell Culture. In: *Cell Therapy Against Cerebral Stroke*. Tokyo: Springer Japan; 2017. p. 49–72.
38. Perry SW, Epstein LG, Gelbard HA. In situ Trypan Blue staining of monolayer cell cultures for permanent fixation and mounting. *Biotechniques.* 1997;22(6):1020-1,

- 1024.
39. Kizivat T, Smolić M, Marić I, Tolušić Levak M, Smolić R, Bilić Čurčić I, et al. Antioxidant Pre-Treatment Reduces the Toxic Effects of Oxalate on Renal Epithelial Cells in a Cell Culture Model of Urolithiasis. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(1):109.
  40. Grieve AP. Medical Statistics. In: *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2013. p. 189–218.
  41. Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Kidney Stones 2012: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):1847–60.
  42. Kizivat T, Smolic M, Bilic-Curcic I, Smolic R, Maric I, Roguljic H, et al. In vitro model of antioxidant prevention of urolithiasis. *Bone Abstr*. 2016.
  43. Shirley DG, Walter SJ, Noormohamed FH. Natriuretic effect of caffeine: assessment of segmental sodium reabsorption in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103(5):461–6.
  44. Ming Z, Lutt WW. Caffeine-induced natriuresis and diuresis via blockade of hepatic adenosine-mediated sensory nerves and a hepatorenal reflex. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(11):1115–21.
  45. Taylor EN, Curhan GC. Demographic, Dietary, and Urinary Factors and 24-h Urinary Calcium Excretion. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(12):1980–7.
  46. Peerapen P, Thongboonkerd V. Caffeine prevents kidney stone formation by translocation of apical surface annexin A1 crystal-binding protein into cytoplasm: In vitro evidence. *Sci Rep*. 2016;6(1):38536.
  47. Nollet L, Toldrá F. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*. CRC Press; 2012.
  48. Coe FL, Evan AP, Worcester EM, Lingeman JE. Three pathways for human kidney stone formation. *Urol Res*. 2010;38(3):147–60.
  49. Doyle W, Shide E, Thapa S, Chandrasekaran V. The effects of energy beverages on cultured cells. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3759–68.
  50. Ferraro PM, Taylor EN, Gambaro G, Curhan GC. Soda and Other Beverages and the Risk of Kidney Stones. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(8):1389–95.

## 10. LITERATURA

---

51. Skolarikos A, Straub M, Knoll T, Sarica K, Seitz C, Petřík A, et al. Metabolic Evaluation and Recurrence Prevention for Urinary Stone Patients: EAU Guidelines. *Eur Urol.* 2015;67(4):750–63.

## 11. ŽIVOTOPIS

### ANAMARIJA BANOVAČ

H. Deker 24

31 400 Đakovo

Hrvatska

(+385) 99 676 10 88

anamarija555@hotmail.com

### OBRAZOVANJE

**Diplomski studij**, Medicinsko laboratorijska dijagnostika (Medicinski fakultet sveučilišta Josip Juraj Strossmayer, Osijek)

**Preddiplomski studij**, Medicinsko laboratorijska dijagnostika (Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci, Rijeka)

### SOCIJALNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Motiviranost prema radnim zadacima; timski duh; komunikativnost; sposobnost prezentiranja informacija grupi; dobre komunikacijske vještine stečene tijekom iskustva kao predstavnica studenata Medicinsko laboratorijske dijagnostike u Studentskom zboru FZS-u te kao mentor studentima nižih godina.

### ČLANSTVA

Predstavnica studenata Medicinsko laboratorijske dijagnostike u Studentskom zboru Fakulteta zdravstvenih studija, Udruga za pomoć djeci s teškoćama u razvoju i poticanje harmoničnog razvoja djece i mladih „DIRA RIJEKA“, članica Hrvatske udruge studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike - CMLDSA.

### **ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE**

Smisao za organizaciju; sposobnost motiviranja suradnika na rad; koordiniranje ljudi tijekom volontiranja u Udruzi DIRA, Rijeka.

### **TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE**

Vještine rada u molekularno-genetičkom laboratoriju; računalne vještine; pretraživanje baza podataka; vješto korištenje Microsoft Office™ alatima; osnovno poznavanje aplikacija grafičkog dizajna (Adobe Illustrator™, PhotoShop™).

### **UMJETNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE**

Vješto pisanje i crtanje; smisao za umjetničko izražavanje; bavljenje standardnim plesom.

### **IZDANJA**

Znanstveni rad: Nadalin, Sergej; Rebić, Jelena; Piragić, Nermina; Banovac, Anamarija; Šendula Jengiće, Vesna; Zaharija, Ira; Buretić-Tomljanović, Alena

Ovisnost o nikotinu i klinička ekspresija shizofrenije u hrvatskoj populaciji, Medicina fluminensis 52 217-223 - 2016.