Bubrežni fenotip kemijski induciranog modela miša za Gaucherovu bolest

Kegalj, Karla

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:829273

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Karla Kegalj

BUBREŽNI FENOTIP KEMIJSKI INDUCIRANOG MODELA MIŠA ZA GAUCHEROVU BOLEST

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Karla Kegalj

BUBREŽNI FENOTIP KEMIJSKI INDUCIRANOG MODELA MIŠA ZA GAUCHEROVU BOLEST

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je napravljen na Medicinskom fakultetu Osijek, Katedra za medicinsku biologiju i genetiku.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 44 radna lista, 5 tablica i 14 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Marija Heffer za savjete i smjernice tijekom školovanja a osobito prilikom izrade ovoga završnoga rada . Veliko hvala Miloradu Zjaliću za pomoć, odgovore na brojna pitanja i puno puno strpljenja i uloženoga vremena kako bi rezultati ovog istraživanja bili što bolji, thank you Master.

Velika hvala mojoj obitelji i prijateljima na pomoći i velikoj potpori tijekom moga školovanja.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Gaucherova bolest 1
1.1.1. Klinička slika 2
1.1.2. Dijagnoza Gaucherove bolesti 2
1.1.3. Terapija Gaucherove bolesti 3
1.2. Animalni modeli 3
1.2.1. Kemijski inducirani model 3
1.2.2. Genetski modificirani modeli 4
1.2.3. Spontano nastali animalni modeli 6
1.3. Lipidne splavi 7
1.3.1. Proteinske i neproteinske sastavnice lipidnih splavi 7
1.3.2. Utjecaj viška glukozilceramida na sastav lipidnih splavi 9
2. HIPOTEZA 10
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 11
4. MATERIJALI I METODE 12
4.1.Ustroj istraživanja 12
4.2. Materijali 12
4.3.Metode 12
4.3.1. Bojenje histoloških preparata hemalaun-eozin metodom 12
4.3.2. Bojenje histoloških preparata PTAH metodom 13
4.3.4. Izolacija lipidnih splavi 16
4.3.5. Bradfordova metoda 17
4.3.6. SDS- PAGE i Western blot 18
4.3.7. Statistička obrada podataka 19
5. REZULTATI 21
5.1. Prikaz morfologije bubrega kontrolnih i eksperimentalnih životinja histološkim bojenjem hemalaun- eozin 21
5.2. Prikaz morfologije bubrega kontrolnih i eksperimentalnih životinja PTAH histološkim bojenjem 22
5.3. Kvantifikacija bubrežnih epitopa kontrolne i eksperimentalne skupine životinja 23
5.4. Analiza raspodjele bubrežnih epitopa u kori i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa 28

5.5. Kolokalizacija Aqp1 i Aqp2 s markerima splavi, ne-splavi i GD1a.....29
5.6. Western blot analiza lipidnih splavi kontrolnih i eksperimentalnih životinja.....31
6. RASPRAVA.....33
7.ZAKLJUČAK.....37
8. SAŽETAK.....38
9. SUMMARY.....39
10. LITERATURA.....40
11. ŽIVOTOPIS.....44

POPIS KRATICA

Aqp1- akvaporin 1

Aqp2- akvaporin 2

BSA- goveđeg serumskog albumina (engl. bovine serum albumin)

FITC- fluorofor fluorescein izocijanat

Flot1- flotilin 1

GBA- β-glukocerebrozidaze

GD- Gaucherov model

GlcCer- glukozilceramid

KBE- konduritol-b-epoksid

LIMP-2 - lizosomalni integralni membranski protein

PMSF- inhibitor serinskih proteaza

RCF- relativna centrifugalna sila

Tfr- transferin

POPIS SLIKA:

Slika 1. Prikaz tipičnog određivanja koncentracije proteina po Bradfordovoj metodi

Slika 2. Prikaz izvođenja SDS-PAGE elektroforeze

Slika 3.Prikaz izvođenja Western blot analize

Slika 4. Morfologija kore i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa prikazana hemalaun-eozin bojenjem, 400X povećanje

Slika 5. Morfologija kore i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa prikazana hemalaun-eozin bojenjem, 200X povećanje.

Slika 6. Morfologija kore i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa prikazana PTAH bojenjem

Slika 7. Prikaz distribucije akvaporina 1 i flotilina 1 u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest

Slika 8. Prikaz distribucije akvaporina 1 i GD1a u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest

Slika 9. Prikaz distribucije akvaporina 1 i transferina u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest

Slika 10. Prikaz distribucije akvaporina 2 i flotilina 1 u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest

Slika 11. Prikaz distribucije akvaporina 2 i GD1a u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest

Slika 12. Prikaz distribucije akvaporina 2 i transferina u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest

Slika 13. Akvaporin 1 u lipidnim splavima i ne splavima

Slika 14. Akvaporin 2 u lipidnim splavima i ne splavima

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Povezanost genotipa i fenotipa za Gaucherovu bolest kod miševa i ljudi

Tablica 2. Primarna protutijela korištena za fluorescentnu imunohistokemiju

Tablica 3. Sekundarna protutijela korištena za fluorescentnu imunohistokemiju

Tablica 4. Statistički prikaz usporedbe bubrežnih epitopa u kori i srži bubrega mjerama aritmetičke sredine, standardne devijacija i p vrijednosti

Tablica 5. Stupanj kolokalizacije aqp1 i aqp2 s flotilinom 1, transferinom i GD1a izražen kao Pearsonov koeficijent kolokalizacije

1. UVOD

1.1. Gaucherova bolest

Gaucherova je bolest rijedak oblik lizosomske bolesti nakupljanja koji je prvi puta opisao Philippe Gaucher u 1882. godini kod pacijenta sa splenomegalijom. Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno, a uzrokovana je nedostatkom lizosomskog enzima β-glukocerebrozidaze (GBA). Zbog nedostatka GBA koja hidrolizira glukozilceramid (GlcCer) u glukozu i ceramid dolazi do nakupljanja GlcCer-a u makrofagima koji uzrokuje njihovu transformaciju u Gaucherove stanice. Stanice su prepoznatljive po povećanoj, acentričnoj jezgri čija citoplazma na histološkim preparatima ima izgled zgužvanoga papira. Najčešće se nalaze u jetri, slezeni i koštanoj srži te uzrokuju hepatomegaliju, splenomegaliju, citopeniju i promjene na kostima (1). Mutacija u *GBA* genu, koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 1 (1q22) i sastoji se od 10 introna i 12 egzona, uzrokuje manjak GBA enzima. U bazi podataka o mutacijama humanih gena evidentirano je više od 300 mutacija *GBA*. Mutacije koje dovode do Gaucherove bolesti najčešće su promašenog smisla (engl.missense mutacije), iako je opisan i veliki broj delecija, insercija i frameshift mutacija (pomak okriva čitanja). Najčešća genetska mutacija u tipu I Gaucherove bolesti je zamjena jednog para baza na kodonu 370, asparagin je zamijenjen sa serinom i ta mutacija poznata je kao N370S mutacija. Mutaciju povezanu s neuropatskim tipom bolesti (tip II i III) uzrokuje zamjena leucina u prolin na kodonu 444, ova mutacija poznata je kao L444P. Tip I najučestaliji je tip bolesti i zahvaća više od 90% oboljelih. Učestalost bolesti u ukupnoj populaciji je 1:40,000, ali u određenim etničkim skupinama, poput aškenaških Židova učestalost bolesti je 1:800. Osim mutacija na *GBA* genu Gaucherova bolest može biti uzrokovana i mutacijom na *PSAP* genu, koja dovodi do nedostatka sapozina C. Pacijenti s ovom mutacijom imaju identične simptome kao oboljeli od Gaucherove bolesti tipa III (2). Deficitit β-glukocerebrozidaze osim genske mutacije može biti uzrokovan i abnormalnostima koje se događaju prilikom transporta enzima do lizosoma. Prolaskom kroz endoplazmatski retikulum može doći do preuranjene degradacije enzima u proteasomu. Transport enzima uključuje nastanak kompleksa GBA i lizosomalnog integralnog membranskog proteina LIMP-2. GBA koja je vezana na LIMP-2 je inaktivna sve dok ne dođe do lizosoma, gdje u kiseloj sredini dolazi do odvajanja enzima i LIMP-2 što omogućava aktivaciju GBA. Iako sam deficit LIMP-2 ne uzrokuje fenotip opisan u Gaucherovoj bolesti može uzrokovati pretvorbu tipa I u tip III (3).

1.1.1. Klinička slika

Gaucherova bolest dijeli se u tri tipa. Tip I je ne-neuropatski oblik i pojavljuje se u 90% slučajeva, klinička slika obuhvaća hepatosplenomegalija, anemija, trombocitopenija i kod manjeg broja pacijenata plućnu hipertenziju, pacijenti nemaju neurološke simptome. Dob bolesnika u kojoj se bolest javlja varira od ranog djetinjstva do odrasle dobi. Tip II i tip III su rijetki i pojavljuju se u samo 5-10% slučajeva. Tip II je akutni neuropatski oblik bolesti katakteriziran teškim oštećenjima središnjeg živčanog sustava zbog kojih pacijenti umiru u ranoj dobi. Bolest se javlja unutar 4-5 mjeseci života, a oboljeli najduže žive do treće godine. Kronični neuropatski oblik bolest je tip III u kojem su neurološke promjene blaže i uključuju demenciju, abnormalne pokrete oka i ataksiju, manje je progresivna od akutnog neuropatskog oblika (tip II) a pacijenti žive do 30-40 godina. Splenomegalija je prvi znak postojanja Gaucherove bolesti u sva tri oblika. Odličan pokazatelj progresije bolesti je veličina i povećanje slezene, u uznapredovaloj fazi bolesti slezena može biti toliko velika da ispunjava cijeli abdomen. Promjene na kostima kod pacijenata s tipom I i III uzrokuju jake bolove, ograničene kretnje i povezane su s visokim postotkom smrtnosti. Pacijenti imaju česte lomove kostiju, osteopeniju, osteoporozu i osteonekrozu. 60% oboljelih pati od Erlenmeyerov deformiteta, odnosno nemogućnosti remodeliranja distalnog dijela femura (4).

1.1.2. Dijagnoza Gaucherove bolesti

Zbog velikoga broja simptoma koji se javljaju kod oboljelih jako je teško prepoznati Gaucherovu bolest. Istraživanja dokazuju kako je samo 20% pacijenata s Gaucherovom bolesti uspješno dijagnosticirano. Do pojava svih simpotma koji upućuju na Gaucherovu bolest dolazi 4 do 10 godina od pojave prvih simptoma. Na Gaucherovu bolest potrebno je sumnjati u svim slučajevima splenomegalije bez poznatoga uzroka, dok je kod djece potrebno isključiti Gaucherovu bolest u svim slučajevima hepatosplenomegalije ili neurodegenerativnih promjena. Kao zlatni standard za dijagnozu Gaucherove bolesti mjeri se aktivnost β-glukocerebrozidaze u leukocitima i kulturi kožnih fibroblasta. 2011. godine stručnjaci su se sastali u Copenhagenu kako bi razvili algoritam za dijagnosticiranje Gaucherove bolesti. Uzimajući u obzir kako su aškenaški Židovi populacija s visokom učestalošću Gaucherove bolesti na bolest se treba posumnjati pri pojavi blage citopenije i splenomegalije. U slučaju bolesnika koji nisu askenaški Židovi na bolest se treba posumnjati kada su se isključile sve maligne bolesti koje mogu uzrokovati iste simptome kao Gaucherova bolest (5).

1.1.3. Terapija Gaucherove bolesti

Do 1990. terapija za Gaucherovu bolest uključivala je liječenje postojećih simptoma splenektomijom, zamjenom kuka i lijekovima protiv boli. Nakon 1990. dolazi do otkrića enzimske nadomjesne terapije koja je najčešće korištena terapija u liječenju bolesti ali ima neželjene učinke kao što su anafilaktička reakcija, mučnina, povraćanje, glavobolja, vrtoglavica i kašalj. Više od 5000 pacijenata liječi se imiglucerazom (Cerezyme®) koja je modificirani oblik ljudske β-glukocerebrozidaze i proizvodi se tehnologijom rekombinantne DNK na staničnoj kulturi sisavaca, terapija je jako učinkovita za liječenje visceralnih i hematoloških problema ali nema učinka na koštano-zglobni sustav. Ovaj lijek je indiciran kao dugotrajna enzimska nadomjesna terapija kod bolesnika s potvrđenom dijagnozom Gaucherove bolesti tipa I i tipa III. Imiglucezara ne pomaže kod neuroloških tegoba zato što ne prolazi krvno moždanu barijeru. Osim enzimske nadomjesne terapije postoji terapija malim molekulama (šaperonima). Šaperoni prolaze krvno-moždanu barijeru i uzimaju se oralno za razliku od imigluceraze koja se uzima intravenozno. Učinak šaperona vidljiv je kod bolesnika koji su imali N370S mutaciju ali nikada kod osoba s L444P mutacijom, to pokazuje kako šaperoni nisu dovoljno specifični i ne mogu biti terapija za sve pacijente s Gaucherovom bolesti (6).

1.2. Animalni modeli

Animalni model za Gaucherovu bolest jako je važan za proučavanje fenotipa i patoloških mehanizama koje mogu uzrokovati različite tipove ove bolesti. Animalni modeli mogu se klasificirati u tri kategorije, prva kategorija su kemijski inducirani miševi koji nastaju injektiranjem inhibitora lizosomalnog enzima β-glukocerebrozidaze. Druga kategorija su genski modificirani miševi koji su jako bitni za proučavanje gubitka funkcije specifičnog gena na fenotip bolesti. Treća kategorija uključuje spontano nastale modele koji razvijaju Gaucherovu bolest.

1.2.1. Kemijski inducirani model

Glavna je karakteristika Gaucherove bolesti nakupljanje glukozilceramida zbog nedostatka enzima β-glukocerebrozidaze , zbog toga se animalni modeli miša induciraju s konduritol-b-epoksidom (KBE). KBE je ireverzibilni inhibitor ß-glukocerebrozidaze,

inhibicija ove lizosomalne glukozidaze uzrokuje nakupljanje GlcCer bez utjecaja na vijabilnost stanice i otpuštanje lizosomalnih enzima ili aktivnosti intracerulalnih enzima. Problem koji se pojavljuje kod korištenja KBE je specifičnost ovog inhibitora koji u visokim koncentracijama inhibira i druge glukozidaze kao što je α- glukozidaza (7).U vremenskom periodu od tri tjedna, miševima se inducira KBE intraperitonealno što rezultira akumulacijom GlcCer u jetri, slezeni i mozgu. Kako bi u miševima došlo do još većeg nakupljanja GlcCer u miševe se injektira KBE u kombinaciji s GlcCer. Problem u radu s kemijski induciranim miševima je što nakon 7-12 dana razviju teške neurološke simptome i umiru od lezija na mozgu. Iako se ovaj model ne koristi često, zbog kratkog životnog vijeka, jeftin je za proizvodnju pa se može koristiti za proučavanje učinkovitosti novih terapija na neurološke simptome.

1.2.2. Genetski modificirani modeli

Prvi genetski inducirani model za Gaucherovu bolest nastao je 1992. godine insercijom *Neo cassette* (DNA sljeda koji uvodi preuranjeni STOP kodon) u egzone 9 i 10 *Gba* gena što je rezultiralo akumulacijom glukozilceramida u jetri, mozgu, slezeni i lizosomima slezene te jetrenim makrofagima. Ovaj model uzrokuje proizvodnju miševa s teškim neurološkim problemima koji imaju isti fenotip kao pacijenti s Gaucherovom bolesti tipa II. Zbog kratkog životnoga vijeka ovaj model miša nije se pokazao korisnim jer ne daje dovoljno vremena za proučavanje patogenih mehanizama. Drugi model miša korišten za istraživanja baziran je na točkastim mutacijama. Budući da miševi i ljudi imaju, u prosjeku 85% gensku homologiju znanstevnici su pokušali proizvesti model s mutacijama kao što je L444P koji uzrokuje Gaucherovu bolest tipa II. Miševi s rekombinantnim alelom poznatim kao RecNcil mutacija (L444P) i miševi homozigoti za L444P mutaciju nastaju insercijom mutagena. RecNcil i homozigoti su bili abnormalni pri rođenju sa crvenom zgužvanom kožom, obje vrste miša umrle su nedugo nakon rođenja. Životni vijek miševa produžen je križanjem miševa s L444P mutacijom i miša s isključenim genom koji kodira protein odgovoran za sintezu GlcCer. Miševi su živjeli duže od homozigota i RecNcil miševa, oko 50% miševa doživjelo je godinu dana i aktivnost GBA bila je oko 15-20% što se podudara s aktivnosti enzima kod bolesnika s tipom I Gaucherove bolesti. Međutim, GlcCer se ne nakuplja u tkivima i nisu otkrivene Gaucheove stanice i ostali simptomi tipični za Gaucherovu bolest. Ovaj animalni model koristi se za istraživanja učinkovitosti terapije šaperonima (8).

Najveći problem u istraživanjima Gaucherove bolesti je stvaranje modela koji ispoljavaju simptome pacijenata s Gaucherovom bolesti tipa I. Model za Gaucheovu bolest tipa I otkriven je 2006. godine. Miševi su nastali koristeći *Mx1-Cre-loxP* sustav koji dozvoljava Cre posredovanu deleciju *Gba* gena, a miševima je nakon rođenja injektirana poliinozinska-policitidilična kiselina koja je održavala aktivnost GBA tijekom razvoja. Miševi su imali normalan životni vijek i nisu imali nikakvih koštanih i neuroloških simptoma, te su imali Gaucherove stanice u koštanoj srži , slezeni i jetri ali ne u mozgu.

Miševi za istraživanja Gaucherove bolesi tipa II nastaju križanjem transgeničnih kreatinin-14-Cre miševa i miševa nastalih insercijom IoxP-Neo-IoxP (lnl) cassette u *Gba* intron 8, te se tako stvaranju K14-lnl/lnl miševi. K14-lnl/lnl miševi imaju izrazito niske vrijednosti GBA u mozgu,slezeni i jetri, povišene vrijednosti GlcCeri Gaucherove stanice. Neurološi simptomi pojavljuju se 10 dana nakon rođenja i uzrokuju paralizu i napadaje koji su povezani s gubitkom neuroloških funkcija i aktivacijom mikroglije. Ovaj model miša jako je bitan jer pokazuje sve simptome koje imaju pacijenti s Gaucherovom bolest tipa II i imaju povišene biokemijske parametre pa tako omogućavaju istraživanja patogenih mehanizama i potencijalnih terapija za tip II Gaucherove bolesti.

Za istraživanja na neurološkom tipu bolesti koristi se i nestin-flox/flox miš. Model je diznajniran flankiranjem *Gba* gena s dva IoxP mjesta. U ovim miševima razina GlcCer je snižena u mozgu ali nije snižena u jetri i slezeni. Miševi razvijaju simptome slične K14-lnl/lnl miševima ali imaju odgođenu pojavu neuroloških simptoma. Kod K14-lnl/lnl miševa neuurološki simptomi nastupaju nakon 10 dana, dok se kod nestin-flox/flox miševa neurološki simptomi javljaju nakon 16 dana. Glavna prednost nestin-flox/flox miševa je što žive duže pa omogućavaju dublju analizu patoloških mehanizama u razvoju bolesti (9).

Razvijeni su i modeli miša na temelju poveznica između genotipa i fenotipa koji uzrokuju Gaucherovu bolest kod ljudi. Vidljivo u Tablici 1. osobe koje su homozigoti za N370S imaju simptome povezane s Gaucherovom bolesti tipa I i ne razvijaju neurološke probleme, suprotno tome homozigotnost N370S kod miševa bila je smrtonosna u neonatalnom razdoblju. Homozigoti na D409H razvijaju bolesti unutarnjih organa i ranu pojavu neuroloških problema. Ti pacijenti također mogu razviti karakteristične kalcifične abnormalnosti aortnih zalistka i uzlazne aorte. Genotip V394L/L444P uzrokuje teške visceralne i neurološke probleme kod ljudi dok kod miševa uzrokuje manje visceralne probleme (10).

Tablica 1. Povezanost genotipa i fenotipa za Gaucherovu bolest kod miševa i ljudi

GENOTIP	SIMPTOMI KOD LJUDI	SIMPTOMI KOD MIŠEVA
D409H/D409H	Teški neurološki i visceralni simptomi	Blaži visceralni simptomi
N370S/N370S	Varijabilni visceralni simptomi	Smrt u neonatalnom periodu
L444P/L444P	Varijabilni visceralni i neurološki simptomi	Smrt u neonatalnom periodu
V394L/L444P	Kronični visceralni i neurološki simptomi	Manji visceralni problemi

1.2.3. Spontano nastali animalni modeli

Australski svilenkasti terijer star 8 mjeseci bio je prvi nemišji model za istraživanje Gacherove bolesti. Terijer je imao sniženu aktivnost GBA, Gaucherove stanice u jetri, limfnim čvorovima i mozgu ali ne i u slezeni te neurološke simptome. Pokusi na australskim svilenkastim terijerima nisu odobreni pa se ovaj model više ne koristi za istraživanja. Nedavno je otkriven drugi nemišji model, ovca iz Southdown farme u saveznoj državi Victoria na jugoistoku Australije. Kod ovih ovaca bolest se pojavljuje prirodno i zahvaća janjad. Oni pokazuju neurološke simptome, nemogućnost stajanja i imaju abnormalnu i tvrdu kožu pri rođenju, nakon rođenja žive samo nekoliko dana. Aktivnost GBA snižena je, a primijećeno je i nakupljanje GlcCer. Zabilježene su i patološke promjene u središnjem i perifernom živčanom sustavu. Analiza mutacija otkrila je dvije homozigotne mutacije promašenog smisla, a jedna od njih pojavljuje se i kod ljudi. Ova ovca trenutno je jedini animalni model koji spontano razvija mutaciju koja uzrokuje Gaucherovu bolest a odobren je za korištenje u istraživačke svrhe(9).

1.3. Lipidne splavi

Lipidne splavi najvećim dijelom građene su od sfingomijelina, kolesterola i glikosfingolipida, a u tvorbi splavi sudjeluju i proteini s GPI sidrom (tirozin i Src kinaze), flotilini, aneksini i kaveolini. (11). Za otpočinjanje nekih membranskih procesa (adhezije, signalizacije itd.) molekule lipidnih splavi moraju se grupirati zajedno. Grupiranje membrane u splavi može se postići s obje strane stanične membrane. Antitijela, antigeni ili proteini koji vezuju komponente lipidnih splavi kao što su kolera toksin B grupiraju splavi na izvanstaničnoj strani membrane. Proteini koji pomažu u grupiranju splavi s citoplazmatske strane su aneksini i flotilini. Tako grupirane komponente splavi služe za staničnu signalizaciju i membranski prijenos tvari (12).

1.3.1. Proteinske i neproteinske sastavnice lipidnih splavi

Sfingolipidi su skupina lipida koji se nalaze u svim eukariotskim i nekim prokariotskim stanicama. Oni sudjeluju u staničnoj signalizaciji, regulaciji staničnoga rasta, diferencijaciji i međustaničnoj komunikaciji. Neki sfingolipidi djeluju kao drugi glasnici za faktore rasta, citokine, faktore diferencijacije i toksine. Ceramid je najjednostavniji sfingolipid i služi kao prekusor za sintezu tri glavna tipa kompleksnih sfingolipida, a to su sfingomijelin, glikosfingolipid i gangliozidi. Sfingomijelin je sastavni dio mijelinske ovojnice i nastaje vezanjem fosforilkolina na krajnju hidroksilnu skupinu ceramida. Glikosfingolipidi su ceramidi s jednim ili više šećernih ostataka vezanih ß-glikozidnom vezom na 1-hidroksil poziciji. Gangliozidi su građeni od glikosfingolipida na koji je vezana jedna ili više sijalinskih kiselina. Gangliozidi su najzastupljeniji u mozgu, osobito u sivoj moždanoj tvari gdje su neophodni za normalnu funkciju živčane stanice (13).Osim ceramida u endoplazmatskom retikulumu sintetizira se i kolesterol koji pridonosi čvrstom pakiranju lipida, te ispunjava prostore između sfingolipida. Kolesterol ima veći afinitet za sfingolipide uključene u strukturu lipidnih splavi nego za fosfolipide u staničnoj membrani, pa se uz pomoć kolesterola može procijeniti jesu li ti proteini u staničnoj membrani povezani s lipidnim splavima ili ne. Uklanjanje kolesterola iz lipidnih splavi dovodi do disocijacije proteina koji sudjeluju u strukturi lipidnih splavi i pretvara ih u nefunkcionalne. Kolesterol za stanicu može biti i toksičan pa njegova koncentracija mora biti jako kontolirana regulacijom transkripcije biosinteze kolesterola (14).

Flotilin 1 i flotilin 2 su membranski protein koji formiraju staničnu membranu svih stanica sisavaca i sudjeluju u staničnoj signalizaciji, endocitozi i interakciji s citoskeletom. Predložen je niz modela kako flotilini mogu funkcionirati u različitim staničnim procesima a ostavlja se mogućnost da flotilini djeluju na više načina u istom procesu. Jedan model predlaže da flotilinske mikrodomene djeluju kao signalna platforma, dodatna mogućnost je da flotili djeluju regulatorno osjećajući promjene u svojstvima membrane kao što su promjene lipidnog sastava ili napetost membrane. Osim značajnih funkcija u kontoli sastava lipidnih splavi i interakcijama s citoskeletom flotilini se smatraju važnim markerima lipidnih splavi jer su netopivi u deterdžentu i lebde u saharoznom gradijentu gustoće (15).

Akvaporini su porodica membranskih kanala koji su vrlo propusni za vodu. Istraživanjima je dokazana kolokalizacija flotilina 2 i GM1 gangliozida, koji su integralni membranski proteini i nalaze se u lipidnim splavima, s aqp5 što upućuje na to da su akvaporini komponenta lipidnih splavi . Do danas je poznato 13 akvaporina kod sisavaca, od kojih je prvi identificirani akvaporin bio akvaporin 1 koji je izražen na brojnim mjestima uključujući vaskularni endotel, epitel proksimalnog bubrežnog tubula, bilijarni epitel i koreroidni pleksus. Istraživanja na miševima i ljudima pokazuju kako akvaporini imaju veliku ulogu u plućnoj vaskularnoj permeabilnosti i koncentraciji urina te sudjeluju u staničnoj migraciji i angiogenezi (16). Dokazano je kako delecija gena za akvaporine uzrokuje poliuriju i smanjenje osmolalnost urina. Poliurija uzrokovana delecijom gena *aqp1* nastaje na dva načina, oslabljenom reapsorpcijom vode u proksimalnom tublu i smanjenom medularnom hipertoničnosti. Razvijeno je i nekoliko modela miša s delecijom *aqp2* i dokazano kako ovaj gen kodira važan vodeni kanal kontroliran vazopresinom, iznimno važan za koncentriranje urina.

Osim lipidnih splavi postoje i kalveole koje su varijanta lipidnih splavi, a pojavljuju se kao invaginacija na staničnoj membrani i karakterizirane su prisutnošću proteina kaveolina. In vitro istraživanja ukazuju na to da kaveolini mogu djelovati kao aktivatori inzulinskog receptora. Postoje tri kalveolina, kavleolin -1,-2 i -3. Svi kalveolini povezani su s lipidnim splavima. Miševi koji nemaju kalveoline rođeni su potpuno zdravi ali detaljnijom analizom primjećeni su teški poremećaji pluća, proliferacije endotelnih stanica i fibroza. Analiza miševa bez kalveolina pokazuje kako je kod njih funkcija lipidnih splavi sačuvana što upućuje na to da kalveolini nemaju važniju ulogu u strukturi lipidnih splavi (14).

1.3.2. Utjecaj viška glukozilceramida na sastav lipidnih splavi

Značajna povećanja koncetracije glukozilceramida i smanjen postotak kolesterola dovode do izmjenjenog sastava lipidnih splavi. Izmijenjena homeostaza sfingolipida i kolesterola čini lipidne splavi manje uređenima i povećava fluidnost membrane. Pored toga uočene su i značajne promjene u duljini i stupnju zasićenja lipida unutar lipidnih splavi. Prilikom inkubacije neurona s konduritol- B- epoksidom zamijećeno je povišeno otpuštanje Ca^{2+} iz stanica što je rezultiralo povišenom osjetljivošću na neurotoksične tvari, naročito glutamat. Neravnoteža unutar staničnih membrana neuronskih stanica može biti ključni faktor u pokretanju kaskadnog procesa koji vodi do neurodegeneracije (17).

2. HIPOTEZA

Kemijska indukcija Gauchera dovodi do promjena u funkciji i morfologiji bubrega koje su posljedica promjene sastava lipidnih splavi epitelnih stanica bubrega.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovoga istraživanja su:

- Klasičnim histološkim bojenjima prikazati morfologiju bubrega miševa s inhibiranom razgradnjom GlcCera-a u odnosu na miševe divljeg tipa
- Protutijelima na gangliozide prikazati raspodjelu gangliozida u tkivu bubrega Gaucher modela (GM) i divljeg tipa (WT)
- Protutijelima na flotiline vizualizirati lipidne splavi, a tranferinskim protutijelima vizualizirati ne-splavi u GM i WT
- Protutijelima na akvaporine (aqp1, aqp2, mSglt1, mSglt2) odrediti položaj akvaporina u bubrezima GM i WT
- Western blot analizom utvrditi sastav lipidnih splavi u GM i WT

4. MATERIJALI I METODE

4.1.Ustroj istraživanja

Studija je ustojena kao istraživanje parova (životinje divljeg tipa prema mišjem modelu Gauchera induciranog konduritol B epoksidom).

4.2. Materijali

Istraživanje obuhvaća arhivski materijal bubrega koji se uzeo žrtvovanjem osam životinja:, 4 eksperimentalna miša tretirana s inhibitorom konduritolom b epoksidom kako bi se dobio model Gaucherove bolesti i 4 netretirana miša. Svih osam životinja bilo je soja C57black/6. Netretirani miševi predstavljaju kontolnu, a tretirani eksperimentalnu skupinu. Životinje su uzgojene i žrtvovane u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek u sklopu HRZZ projekta „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ voditeljice M. Heffer. Za studiju je dobiveno etičko dopuštenje Medicinskog fakulteta u Osijeku (Klasa: 602-04/18-08/07, Broj: 2158-61-07-18-18) i Ministrstva poljoprivrede RH (Broj: 525-61-07-18-01)

4.3.Metode

Uzorci su podijeljeni tako da je dio svakog uzorka brzo smrznut (taj dio je dalje korišten za izolaciju lipidnih splavi), a ostatak uzorka je fiksiran u 4%-om paraformaldehidu, te krioprotektiran u saharozi tijekom 24 sata i onda smrznut. Fiksirani uzorci korišteni su za rezanje na kriostatu na debljinu od 20 µm. Izrezana tkiva potom su zalijepljena na želatinizirana stakla i tako korištena za imunohistokemiju.

4.3.1. Bojenje histoloških preparata hemalaun-eozin metodom

Bojanje tkiva hemalaun- eozinom provedeno je prema sljedećem protokolu:

- Ksilen 1, 10 minuta
- Ksilen 2, 10 minuta
- Dehidracija sa 100% etanolom, 10 min
- Dehidracije u seriji etanola (100%, 96%, 70%, 50%) po 5 minuta
- Ispiranje destiliranom vodom, 5 minuta
- Bojanje hemalaunom, 10 minuta

- Ispiranje tekućom vodom, 10 minuta
- Ispiranje destiliranom vodom, 1minutu
- Bojanje eozinom, 2 minute
- serija etanola (70%, 96%, 100%), 2 minute
- uklanjanje etanola ksilenom, 5 minuta

4.3.2. Bojenje histoloških preparata PTAH metodom

Bojenje tkiva PTAH metodom radi se prema sljedećem protokolu:

1. Deparafiniziranje i hidratiziranje rezova u destiliranoj vodi, 1 minutu
2. Ispiranje tekućom vodom, 10 minuta
3. Uranjanje u Langeronovu otopinu, 20 minuta
4. Tretiranje rezova s 5% natrijevim tiosulfatom, 1 minutu
5. Ispiranje u destiliranoj vodi, 5 minuta
6. Bojanje s PTAH otopinom 2 sata pri temperaturi od 56-60ºC
7. Dehidratacija uzoraka u 95% alhoholu, apsolutnom alkoholu i ksilenu

Priprema PTAH otopine:

Otopiti 1 g hematoksilina ($C_{16}H_{14}O_6$) i 500 mL destilirane vode pri temperaturi manjoj od 60ºC, ohladiti 10 minuta te potom dodati 0,1777 g kalijevog permanganata i ostaviti da odstoji. U drugoj posudi promiješati 500 mL destilirane vode i 20 g fosfotungstične kiseline (PTA -$H_3PW_{12}O_{40}$). Pripremljene otopine promiješati i ostaviti da odstoje sat vremena, nakon sat vremena PTAH otopina spremna je za upotrebu.

4.3.3. Imunohistokemija

Fiksirani bubrezi izrezani su na kriostatu (Leica CM3050 S), a rezovi su zalijepljeni na želatinizirana stakla. Želatinizirana stakla napravljena su otapanjem 1,5g želatine u pothlađenoj otopini stipse kroma ($KCr(SO_4)_2$ * $12H_2O$). Nakon pripreme otopine za želatinizaciju stakla su 3 puta po 5 minuta umakana u otopinu i osušena. Prije dodavanja primarnog protutijela na rezove je stavljen blocking pufer kako bi se izbjeglo pozadinsko obojenje uzrokovano vezanjem primarnih i sekundarnih protutijela. Blocking je napravljen u vlažnoj komori kroz 2 sata pri temperaturi od +4ºC. Pufer za blokiranje priređen je dodavanjem 1% goveđeg serumskog albumina (BSA, ThermoFisher Scientific, SAD;

kataloški broj 16210072), 5% konjskog seruma i 5% kozjeg seruma u 1 x PBS. Poslije koraka blokiranja nespecifičnog vezanja rezovi se inkubiraju u otopini primarnog protutijela i blokirajućeg pufera. Primarna protutijela za akvaporine aqp1 i aqp2 pripremljena su u razrijeđenju 1:50, protutijela na flotilin i tranferin u razrijeđenju 1:500, dok je anti-GD1a razrijeđen 1:3000 s puferom za blokiranje. (Tablica 2.). U slučaju svih primarnih protutijela, osim anti-GD1a, u otopinu za blokiranje je dodan 1% Triton. Rezovi su inkubirani s primarnim protutijelom u vlažnoj komori 2 dana na +4ºC i zatim isprani u 1 x PBS-u 3 puta po 10 minuta. Nakon ispiranja rezovi su naslojeni otopinom sekundarnog protutijela. (Tablica 3.) te se inkubiraju 4 sata na +4ºC . Poslije inkubacije sekundarna protutijela se ispiru 3 puta po 10 minuta u pothlađenom 1 x PBS-u, a za prvo ispiranje PBS se miješa sa Hoechst bojom koja boja jezgre, u omjeru 1:10000. Na kraju su preparati pokriveni pokrovnim staklom (Menzel-Glaser Coverslips) i slikani pod konfokalnim mikroskopom. Slike su zatim kvantificirane u FIJI programu (18).

Tablica 2. Primarna protutijela korištena za imunohistokemiju

NAZIV PROTUTIJELA	**ORGANIZAM IZ KOJEG PROTUTIJELO POTJEČE**	**VRSTA PROTUTIJELA**	**PROIZVOĐAČ I KATALOŠKI BROJ**
anti-aqp1	Zec	IgG	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta HR-10001 Zagreb, Hrvatska
anti-aqp2	Zec	IgG	
anti-GD1a	Miš	IgG	Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD
anti-trf	miš	IgG	TheroFisher Scientifintific, Massachusetts, SAD, kataloški broj: 13-6800
anti- flot1	miš	IgG	BD Biosciences Franklin Lakes, New Jersey, SAD; kataloški broj: 610821

Legenda: aqp1-akvaporin 1, aqp2-akvaporin 2, flot1-flotilin 1, trf-transferin

Tablica 3. Sekundarna protutijela korištena za imunohistokemiju

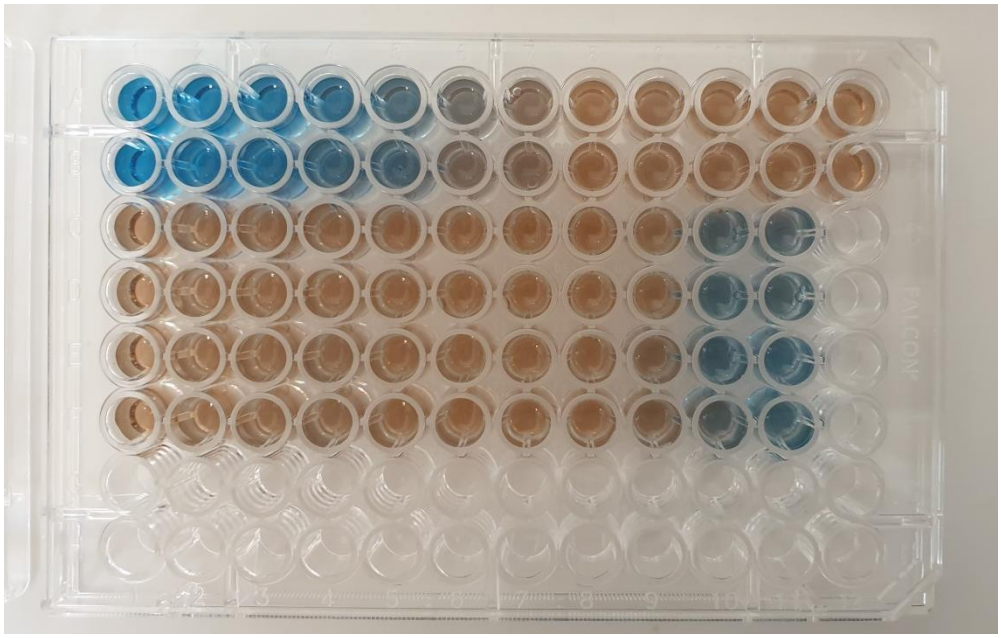
NAZIV PROTUTIJELA	ORGANIZAM IZ KOJEG PROTUTIJELO POTJEČE	VRSTA PROTUTIJELA	PROIZVOĐAČ I KATALOŠKI BROJ
Protuzečje IgG konjugirano s Cyanine Cy3	konj	IgG	Jackson Immunoresearch laboratories, Europe; kataloški broj: 711-165-152
Protutijelo IgG konjugirano s FITC, specifično na fragment $F(ab')_2$	koza	IgG	Jackson Immunoresearch laboratories, Europe; kataloški broj: 115-096-003

4.3.4. Izolacija lipidnih splavi

Od svakog uzorka bubrega odvagano je 50 mg. Tkivo je zatim prebačeno u Whatmanov stakleni homogenizator s tijesnim klipom. Nakon vaganja uzoraka pripremljen je homogenizacijski pufer miješanjem 6,92 mL destilirane vode i koktela inhibitora enzimske aktivnosti(100 mM PMSF fenilmetilsulfonil fluorid, $C_7H_7FO_2S$, 500 mM NaF, 200 mM natrijevog ortovanadata te 1x smjese inhibitora proteaza(Complete Mini EDTA-free Rocher 11836170001)). Nakon homogenizacije uzorci su premješteni u epicu i ostavljeni na ledu 15 minuta prije sonifikacije. Prije sonifikacije također je pripremljena hladna kupelj tako što je 1/5 posude ispunjena etanolom te je do vrha dodan led. Nakon što je epica stajala na ledu 15 minuta premještena je u hladnu kupelj te je napravljena sonifikacija na Bandelin Sonoplus 2070 sonifikatoru 2 puta po 10 sekundi. Homogenat je poslije sonifikacije centrifugiran na 10000g (10000 rcf) 20 minuta pri temperaturi od +4ºC (Rotina 420R, Hetticg Tutteingen, Njemačka). Kada su epice iscentrifugirane, uzorci su nadslojeni različitim udjelima saharoze te stavljeni u ultracentrifugu (Optima XPN, Beckman Coulter) na 200 000 RCF. Centifugiranje je trajalo 20 sati na temperaturi od +4ºC (19).

4.3.5. Bradfordova metoda

Metoda se temelji na pomaku maksimuma apsorbance s 456 nm na 596 nm koji se javlja kada se proteini u uzorku vežu s *Coomassie Brilliant Blue* bojom. Boja se nalazi u Bradfordovom reagensu (Thermo Scientific Pierce Coomassie Plus Protein Assay, 23238) i vezanje proteina i boje uzrokuje prelazak smeđe boje reagensa u plavu boju (slika 1.). Kako bi se izmjerila koncentracija proteina u uzorku potrebno je napraviti standardnu krivulju s poznatim koncentracijama proteina. Za standard se koriste dupla serijska razrijeđenja tako da se u prvu jažicu stavlja standard – 10 mg/mL goveđeg serumskog albumina (engl. bovine serum albumin – BSA) otopljenog u 1 x PBS-u) a u ostale jažice, njegova dvostruka razrjeđenja. Po 10µL pripremljenih duplih serijskih razrjeđenja standarda pomješamo s 200 µL Bradford reagensa kako bi se očitala apsorbanca samoga reagensa. Nakon 5-10 minuta očitana je absorbanca na Bio Rad uređaju (iMark™ Microplate Absorbance Reader) Nakon dobivanja standardne krivulje kvantificirani su proteini u uzorku tako da je 10 µL svakog uzoraka pomiješano s 200 µL Bradfordovog reagensa te je izmjerena absorbancija. (20).



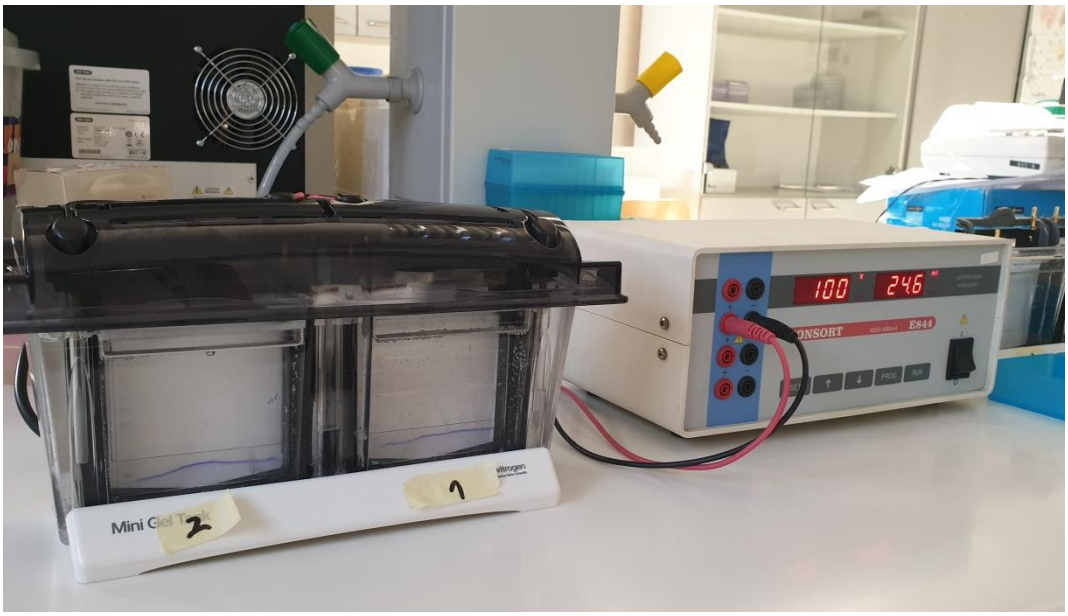
Slika 1. Prikaz tipičnog određivanja koncentracije proteina po Bradfordovoj metodi (fotografirala Karla Kegalj)

.

4.3.6. SDS- PAGE i Western blot

Prije elektroforeze uzorci su skuhani s 20 µL sample pufera (Leammlijev pufer za uzorke, : 6x 20% 1M Tris, 40% glicerol, 0,005% bromfenol plavo, 2% SDS i 5% beta-merkaptoetanol) na 95ºC kroz 5 minuta. Gelovi su stavljeni u sustav za elektorforezu (Mini Gel Tank, kataloški broj A25977) koji je napunjen do vrha 1 x *running* puferom (25mM Tris, 192mM glicin, 0,1% SDS). Potom su u jažice nanešeni uzorci i standard (SeeBlue Plus2 Prestained, Invitrogen by ThermoFisher Scietific; kataloški broj LC5925). U prvu jažicu nanešeno je 3 µL standarda a u ostale jažice 25 µL uzorka. Zatim je sustav zatvoren i spojen na izvor struje (CONSTOR) koji je namješten na 100-V kroz 90 minuta (slika 2.). Kad se u *running* puferu razviju mjehurići smatra se kako je elektroforeza uspješno započela (21).

Nakon elektroforeze odvojena je kazeta s gelom, a gel je prislonjen na filter papir natopljen 1 x transfer puferom (184mM Tris, 140mM glicin i 20%metanol). PVDF membrana (ThermoFisher Scientific, pore size 0,45µm) aktivirana je kroz 30 sekundi inkubacije u metanolu i nakon toga isprana u destiliranoj vodi te potom premještena u 1 x transfer pufer. Western započinje „slaganjem sendviča“ za transfer (ThermoFisher Scientific Mini blot module; kataloški broj: B1000) prema uputama proizvođača tako da se prvo uzme tvrda spužva, pa filter papir na koji je prislonjen gel, zatim aktivirana membrana i na kraju filter papir i tvrda spužva. Uređaj za blotanje spojen je na 200mA kroz 2 sata i stavljen na led (slika 3.). Nakon blotanja izvađena je PDVF membrana. Membrana je prvo blokirana u 3% BSA otopljenog u 1 x PBST-u kroz sat vremena na tresilici (Rotamax 120, Heidolph; kataloški broj: 544-41200-00). Nakon blokiranja membrana je izrezana tako da su odvojeni dijelovi membrane testirani na transferin (80kDa) i flotilin (48kDa). Odvojeni dijelovi membrane inkubirani su preko noći u odgovarajućem primarnom protutijelu (tablica 2.) na +4ºC na rotatoru (Bio RS-24, Biosan, Riga, Latvija). Primarna protutijela za flotilin i transferin razrijeđena su u omjeru 1:2000. Sljedeći dan membrana je isprana 3 puta po 10 minuta u 1 x PBST-u. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane u sekundarnom protutijelu (tablica 3.) 2 sata na sobnoj temperaturi. Potom su isprane 3 puta po 10 minuta u 1 x PBST i vizualizirane na ChemiDoc Imaging sustavu (BioRad, Hercules, CA, SAD) uz automatski određeno vrijeme ekspozicije.(22).



Slika 2. Prikaz izvođenja SDS-PAGE elektroforeze (fotografirala Karla Kegalj)



Slika 3. Prikaz izvođenja Western blot analize (fotografirala Karla Kegalj)

4.3.7. Statistička obrada podataka

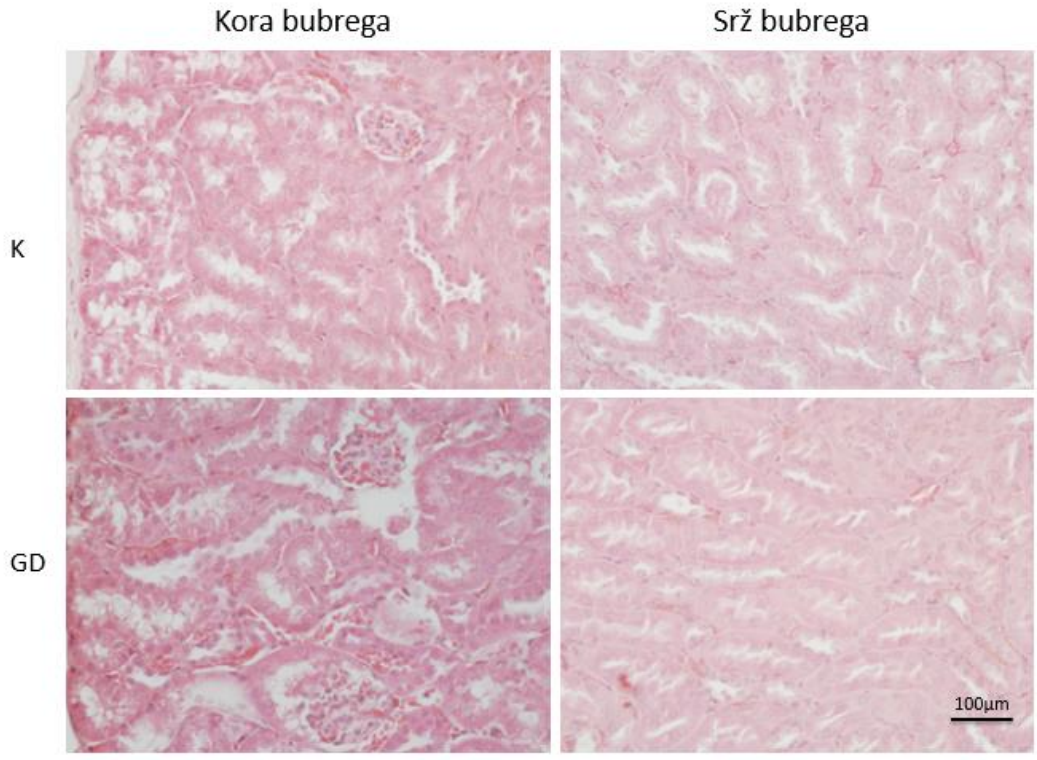
Prikupljeni podaci prikazani su numerički aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom u ostalim slučajevima. Normalnost raspodjele testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike između varijabli nezavisnih skupina utvrđene su Studentovim t-testom i analizom varijance ANOVA u slučaju normalne raspodjele, odnosno Kruskal-Wallisovim i Mann-Whitneyjevim

U-testom u ostalim slučajevima. Sve P vrijednosti bile su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu bit će korišten statistički program (Statistica, inačica 13, Dell, SAD)

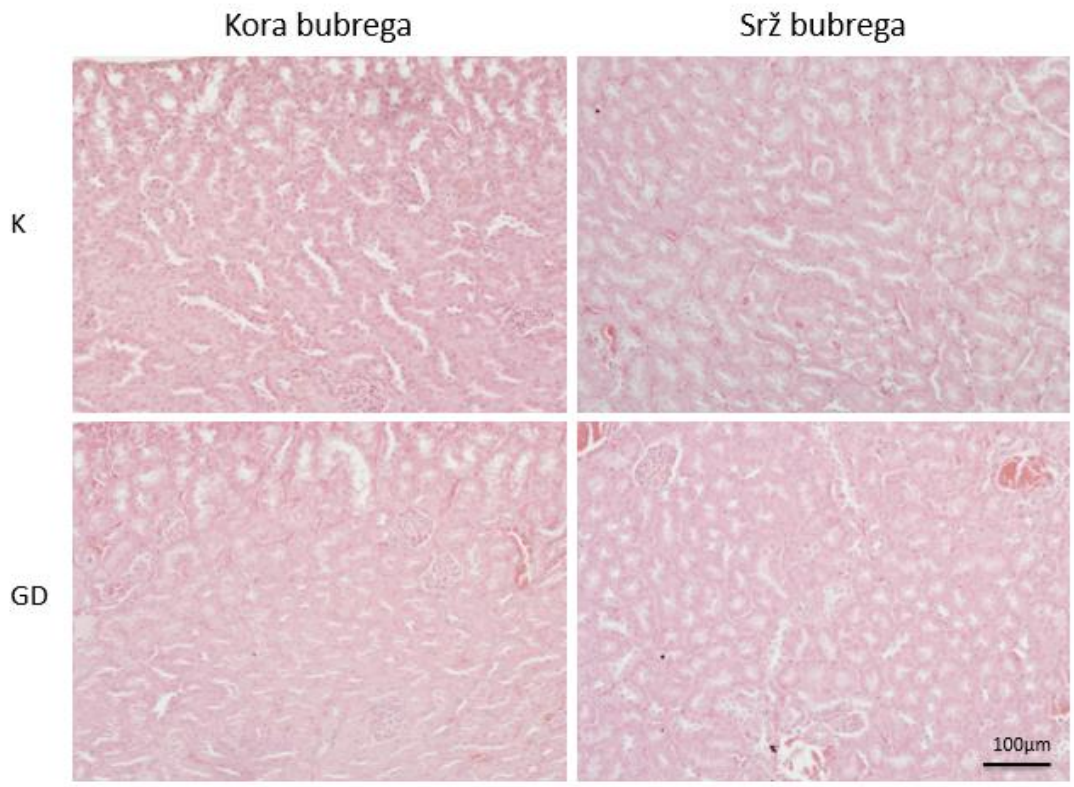
5. REZULTATI

5.1. Prikaz morfologije bubrega kontrolnih i eksperimentalnih životinja histološkim bojenjem hemalaun- eozin

Na 8 fiksiranih uzorka bubrega, od kojih su 4 uzorka iz grupe kontrolnih životinja i 4 uzorka iz grupe eksperimentalnih životinja (Gaucherov model), napravljeno je hemalaun-eozin bojenje. Rezultati bojenja prikazani su na slikama pri povećanju od 200X i 400X. Bojenje kore eksperimentalne grupe je eozinofilnije što može upućivati na nakupljanje proteina unutar citoplazme stanica. Srž bubrega ne pokazuje razliku između kontrolne i eksperimentalne grupe životinja.



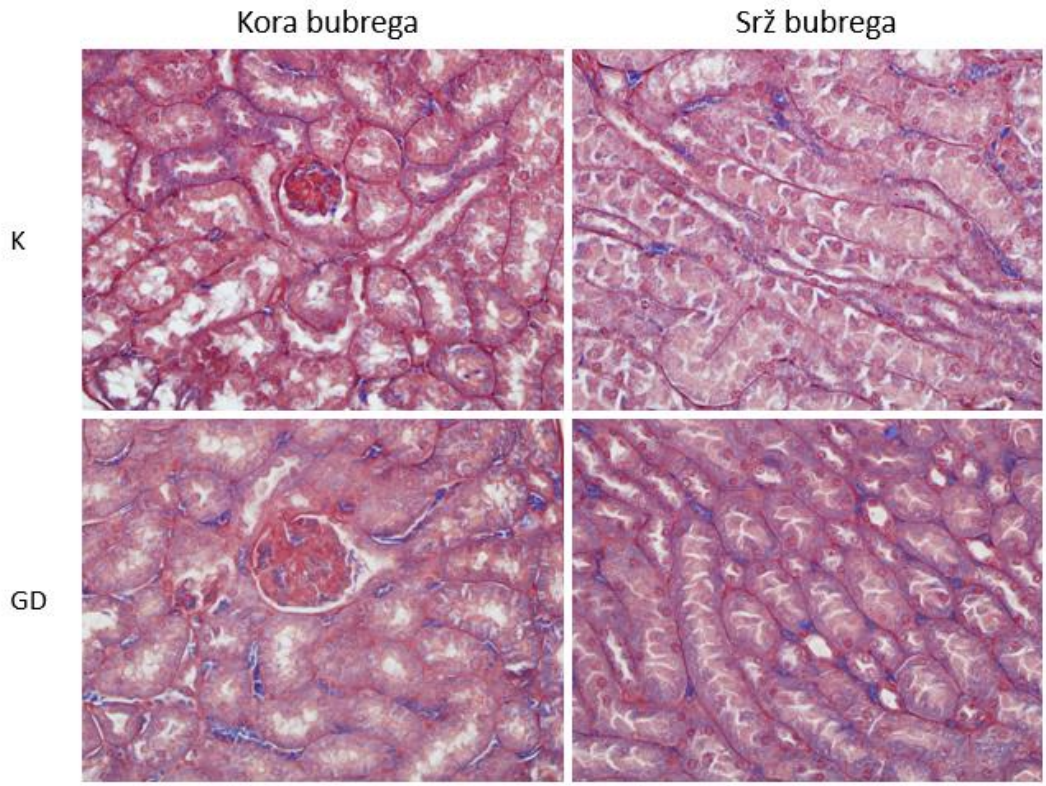
Slika 4. Morfologija kore i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa prikazana hemalaun-eozin bojenjem, 400X povećanje, skala 100 µm. **Legenda**: K-kontrolna grupa, GD-eksperimentalna grupa (Gaucherov model)



Slika 5. Morfologija kore i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa prikazana hemalaun-eozin bojenjem, 200X povećanje, skala 100 µm. **Legenda**: K-kontrolna grupa, GD-eksperimentalna grupa (Gaucherov model)

5.2. Prikaz morfologije bubrega kontrolnih i eksperimentalnih životinja PTAH histološkim bojenjem

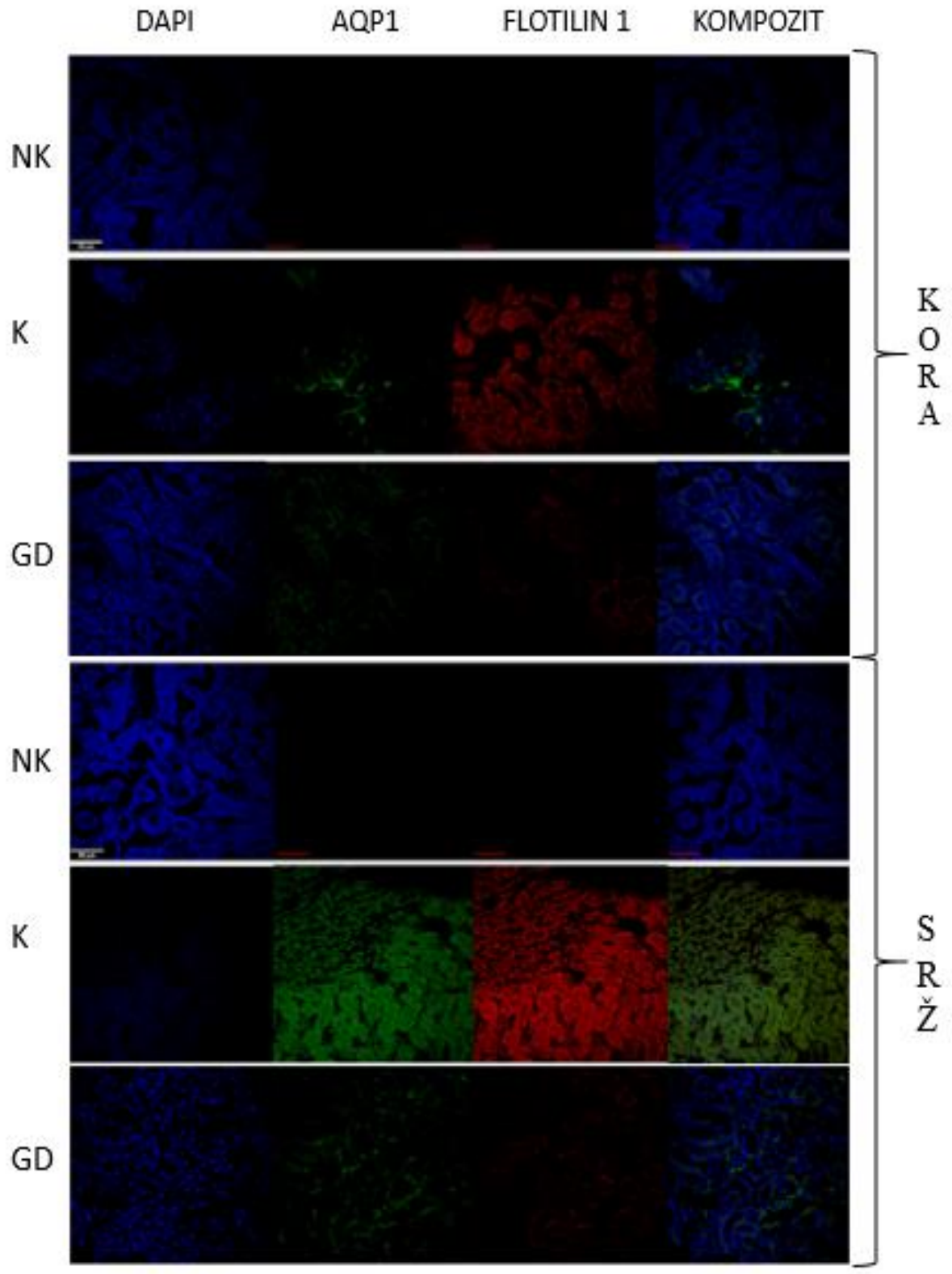
PTAH bojenje koristi se zbog boljeg prikaza ekstracelularnih struktura, citoloških detalja i sitnih abnormalnosti stanica. Ovom metodom mitohondriji su jasno prikazani plavičastom bojom, eksperimentalna skupina ima intezivnije plavičasto obojenje što ukazuje na moguće promjene stukture mitohondrija, osobito one koje se tiču njihove veličine. Osim intenzivnije prikazanih mitohondrija, u eksperimentalnoj grupi životinja difuznije su definirani glomeruli.



Slika 6. Morfologija kore i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa prikazana PTAH bojenjem. Povećanje 400X, skala 100 μm. **Legenda**: K-kontrolna grupa, GD-eksperimentalna grupa (Gaucherov model)

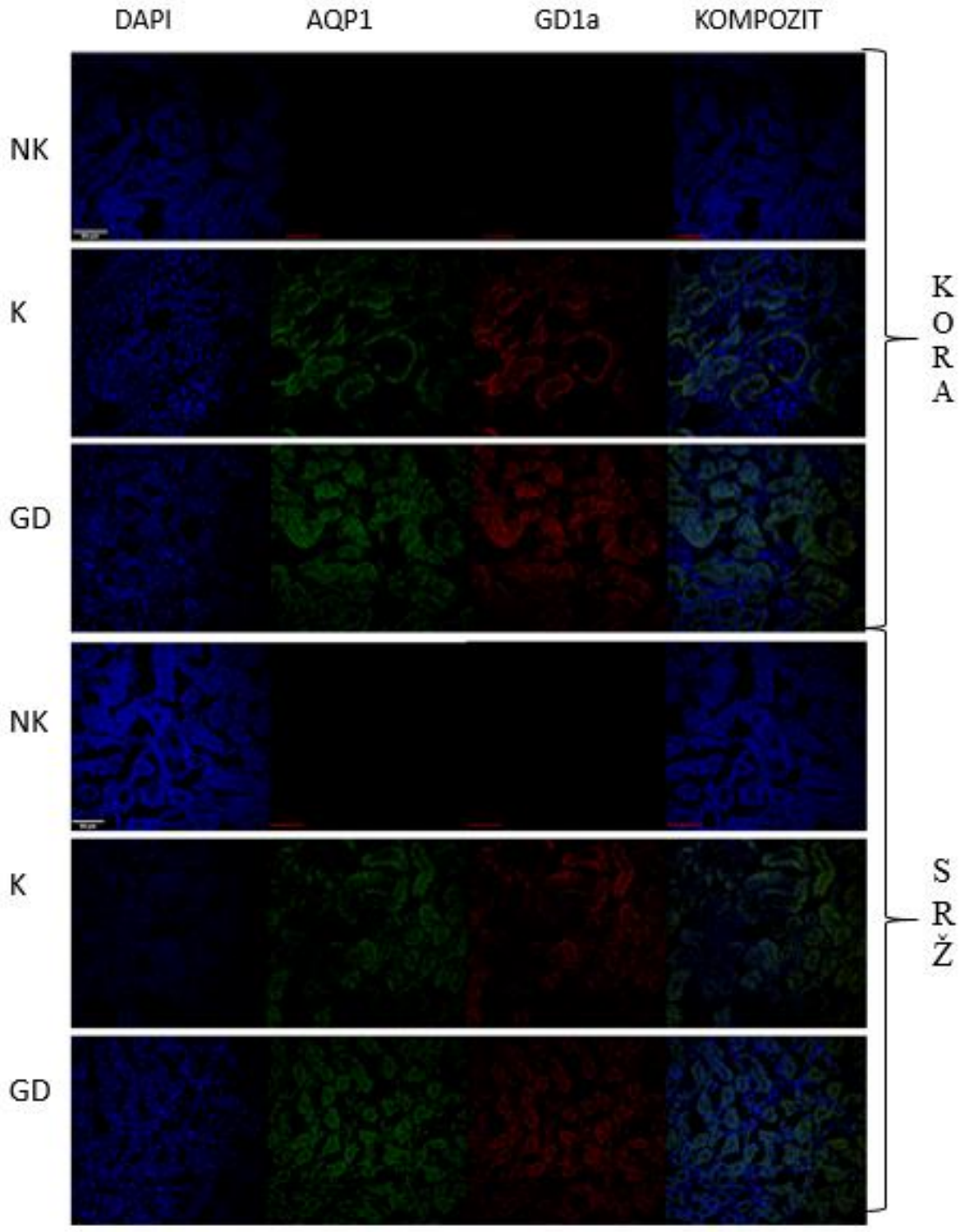
5.3. Kvantifikacija bubrežnih epitopa kontrolne i eksperimentalne skupine životinja

Zbog važne uloge akvaporina u filtacijskoj funkciji bubrega uspoređivane su razlike u promjeni distibucije i ekspresije akvaporina između kontrolne i eksperimentalne grupe životinja (Gaucherov model). U kori GD vidljiva je smanjena ekspresija akvaporina 1 i flotilina 1 , razlika ekspresije između kontolne i eksperimentalne grupe još je jače vidljiva u srži bubrega. U srži kontrolne grupe miševa akvaporin 1 i flotilin 1 gotovo posve kolokaliziraju, a na kompozitnim slikama dobro se vidi veliki nedostatak akvaporina 1 u provodnom sustavu GD životinja.



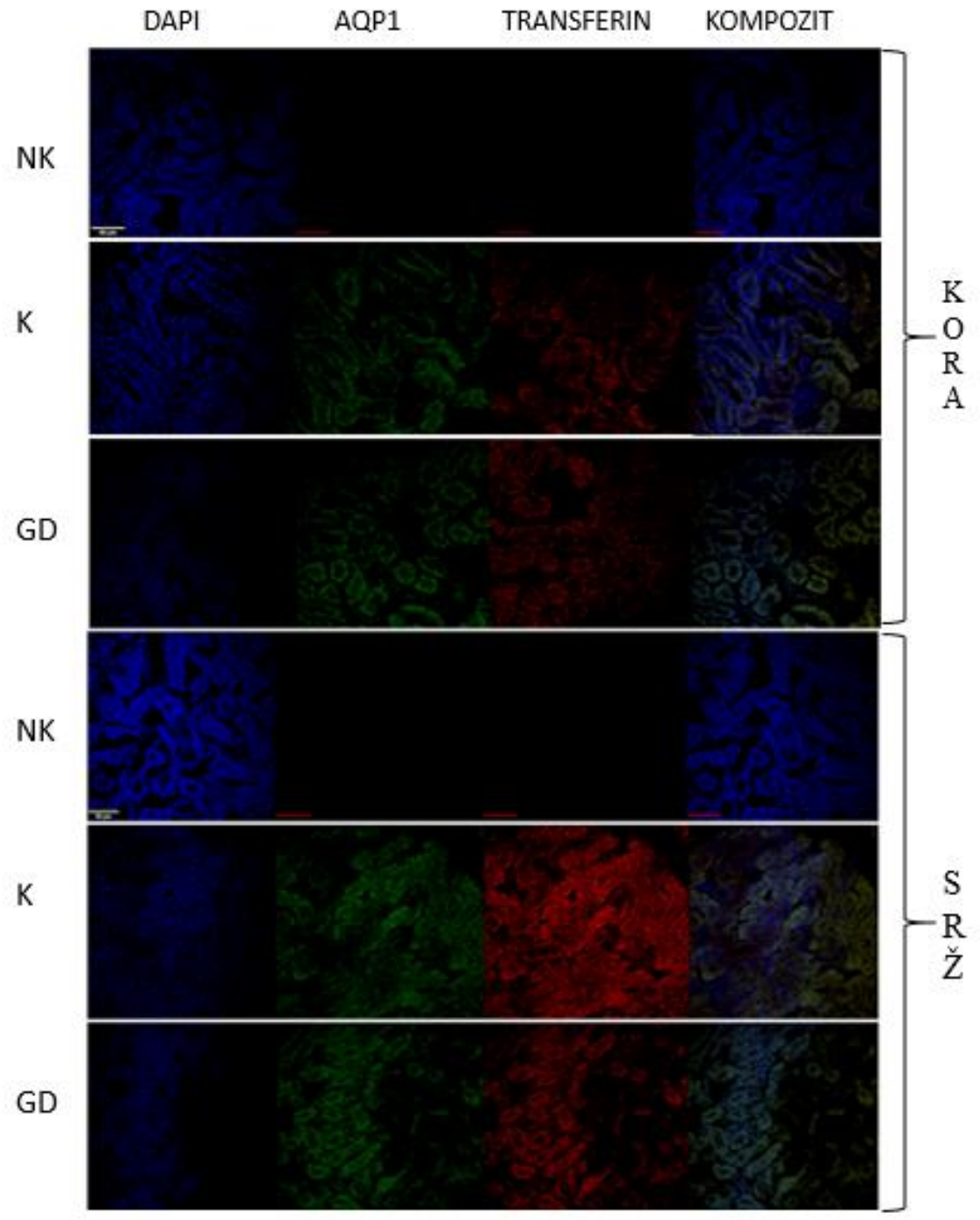
Slika 7. Prikaz distribucije akvaporina 1 i flotilina 1 u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest. **Legenda**: NK- negativna kontrola, K- kontrolna grupa, GD- eksperimentalna grupa (Gaucherov model), aqp1- akvaporin 1.

U kori akvaporin 1 i GD1a gotovo potpuno kolokaliziraju. Eksperimentalna grupa ima veći inzenzitet obojenja akvaporina i GD1a u kori i srži u odnosu na kontrolnu grupu. Stanice glomerula su veće kod GD i difuzno su pozitivne na oba epitopa koji kolokaliziraju.



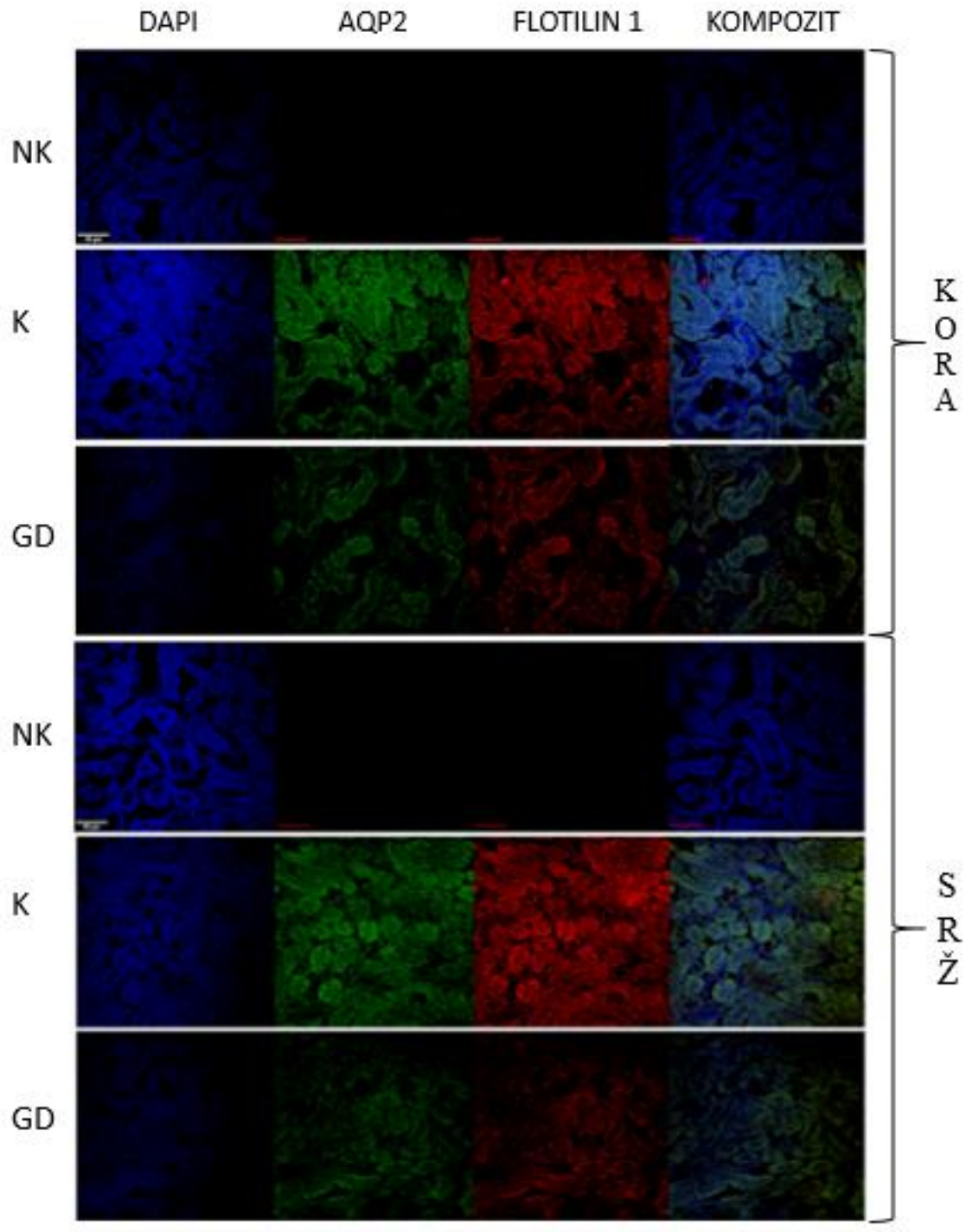
Slika 8. Prikaz distribucije akvaporina 1 i GD1a u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest. **Legenda**: NK- negativna kontrola, K- kontrolna grupa, GD- eksperimentalna grupa (Gaucherov model), aqp1- akvaporin 1..

Akvaporin 1 i transferin manje kolokaliziraju od akvaporina 1 i flotina 1. Aqp1 i transferin bolje kolokaliziraju u GD nego u kontrolnoj grupi životinja. Kontrolna grupa ima veći inzenzitet obojenja akvaporina 1 i transferin u kori i srži u odnosu na eksperimentalnu grupu**.**



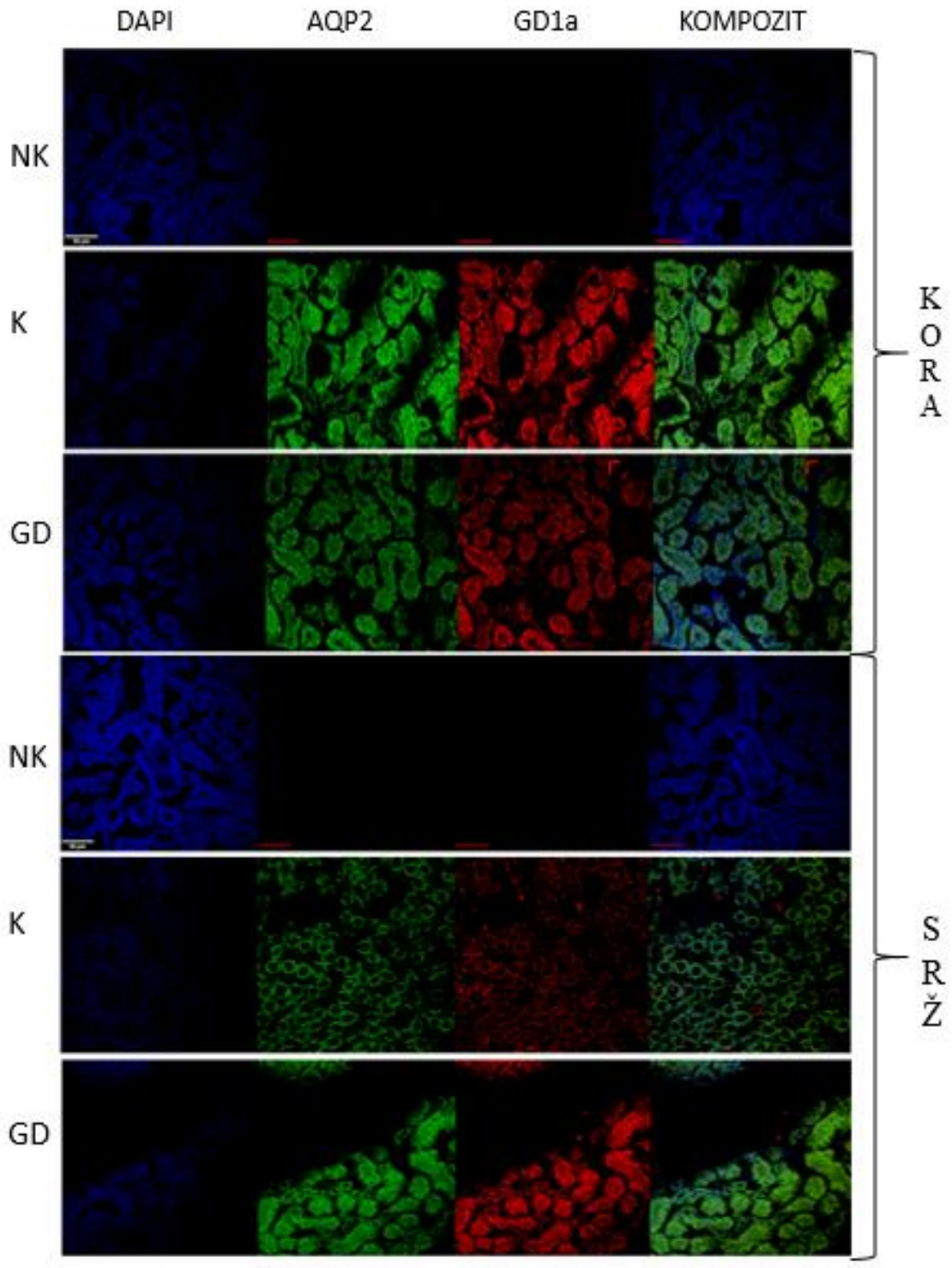
Slika 9. Prikaz distribucije akvaporina 1 i transferina u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest. **Legenda**: NK- negativna kontrola, K- kontrolna grupa, GD- eksperimentalna grupa (Gaucherov model), aqp1- akvaporin 1.

Akvaporin 2 i flotilin 1 puno su jače izraženi u kontrolnoj grupi životinja nego u GD modelu. Za slici je vidljivo kako akvaporin 2 i flotilin 1 gotovo u potpunosti kolokaliziraju u kori i srži kontrolne grupe životinja.



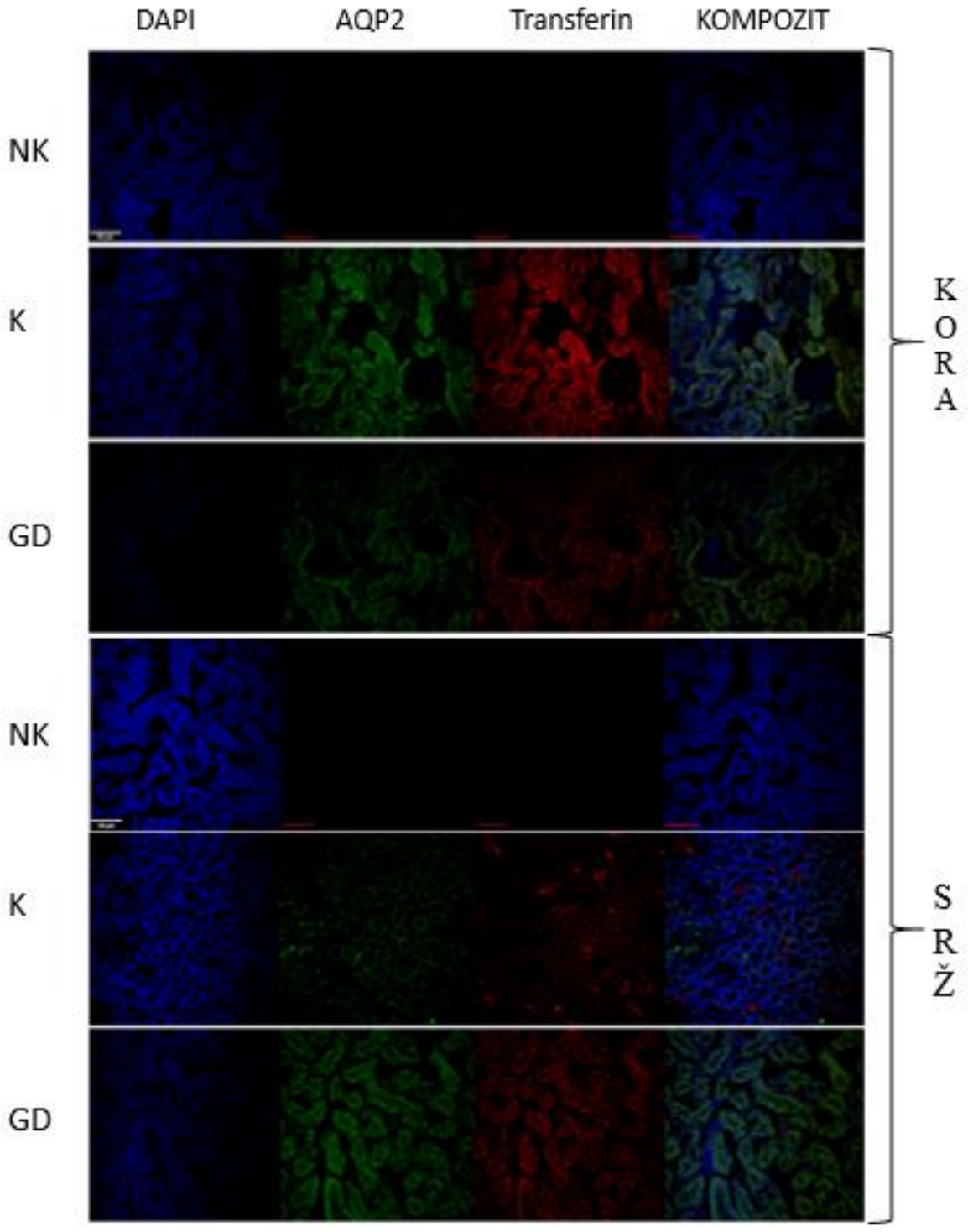
Slika 10. Prikaz distribucije akvaporina 2 i flotilina 1 u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest. **Legenda:** NK- negativna kontrola, K- kontrolna grupa, GD- eksperimentalna grupa (Gaucherov model), aqp2- akvaporin 2.

Ekspresija akvaporina 2 i GD1a puno je jača u kori bubrega nego u srži bubrega. Kontrolna grupa pokazuje jači intenzitet obojenja nego GD model.



Slika 11. Prikaz distribucije akvaporina 2 i GD1a u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest. **Legenda**: NK- negativna kontrola, K- kontrolna grupa, GD- eksperimentalna grupa (Gaucherov model), aqp2- akvaporin 2.

Nema kolokalizacije u provodnom sustavu kontrolnih životinja. Ekspresija akvaporina 2 i transferina jača je u grupi kontolnih životinja nego u GD modelu.



Slika 12. Prikaz distribucije akvaporina 2 i transferina u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i modela za Gaucherovu bolest. **Legenda**: NK- negativna kontrola, K- kontrolna grupa, GD- eksperimentalna grupa (Gaucherov model), aqp2- akvaporin 2.

Osim aqp1, aqp2, transferina, flotilin 1 i GD1a za ovo istraživanje koristila su se protutijela na akvaporine mSglt1 i mSglt2 koja nisu dala nikakvu reakciju zbog toga što je signal protutijela bio preslab te se pomoću njih nije mogao odrediti položaj akvaporina. Analiza rezultat ovih protutijela nije uključena u istraživanje.

5.4. Analiza raspodjele bubrežnih epitopa u kori i srži bubrega kontrolnih i eksperimentalnih miševa

Intenzitet obojenja za svaku sliku izračunat je u programu Image J i izražen u pikselima. Kvantificirano je 2220 slika te je određena aritmetička sredina i SD. U tablici se vide vrijednosti za 5 epitopa. Značajne razlike dobivene su između kore i srži kontrolnih i GD modela za akvaporina 1 i flotilina 1, nisu ustanovljene razlike između kore i srži kontolnih i eksperimentalnih životinja za transferin i GD1a.

Tablica 4. Statistički prikaz usporedbe bubrežnih epitopa u kori i srži bubrega mjerama aritmetičke sredine, standardne devijacija i p vrijednosti

Epitop	Tkivo	Grupa životinja	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	p vrijednost
Aqp1	Kora	K	$6,7x10^6$	$5,2x10^6$	0,025
		GD	$4,3x10^6$	$5,6x10^6$	
	Srž	K	$9,6x10^6$	$9,4x10^6$	0,008
		GD	$3,8x10^6$	$5x10^6$	
Aqp2	Kora	K	$2,1x10^7$	$1,4x10^7$	0,017
		GD	$1,2x10^7$	$8,7x10^6$	
	Srž	K	$2,6x10^7$	$2x10^7$	0,884
		GD	$2,5x10^7$	$1,7x10^7$	
GD1a	Kora	K	$5,5x10^7$	$5x10^7$	0,568
		GD	$3,9x10^7$	$8,3x10^7$	
	Srž	K	$5,1x10^7$	$6,4x10^7$	0,719
		GD	$5,5x10^7$	$5x10^7$	
Flot1	Kora	K	$2,1x10^7$	$1,7x10^7$	0,014
		GD	$8,5x10^6$	$1,2x10^7$	
	Srž	K	$2,7x10^7$	$2,3x10^7$	0,029
		GD	$1,4x10^7$	$1,5x10^7$	
Trf	Kora	K	$1,8x10^7$	$1,7x10^7$	0,696
		GD	$1,5x10^7$	$1,3x10^7$	
	Srž	K	$2,7x10^7$	$3,5x10^7$	0,616
		GD	$2,9x10^7$	$2,9x10^7$	

Legenda: aqp1- akvaporin, aqp2- akvaporin 2, flot1- flotilin 1, trf-transferin, K- kontrolna grupa životinja, GD – eksperimentalna grupa životinja (Gaucherov model)

Raspodjela pokazuje kako su koncentracije akvaporina 1 u kori i srži kontrolnih životinja više nego koncentracije akvaporina 1 u kori i srži eksperimentalnih životinja. Ekspresija akvaporina 1 unutar kore ($p<0.05$) i srži ($p<0.01$) eksperimentalnih životinja značajno opada dok je promjena u ekspresiji akvaporina 2 zamjetna samo u kori bubrega te također pada u eksperimentalnih životinja ($p<0.05$). Razine flotilina 1 u eksperimentalnoj skupini u kori i srži su u značajnom padu ($p<0.05$) i prate pad akvaporina 1.

5.5. Kolokalizacija Aqp1 i Aqp2 s markerima splavi, ne-splavi i GD1a

Razmještanje akvaporina 1 u kori bubrega nema statističke značajnosti. Akvaporin 2 se premješta između splavi i nesplavi te se ovaj efekt očituje nakon tretmana gdje dolazi do njegovog značajnog promještanja iz frakcija splavi i smanjenja kolokalizacije s flotilinom 1($p<0.05$) i transferinskim receptorom ($p<0.05$). Kolokalizacija Akvaporina 1 unutar srži bubrega značajno opada s flotilinom 1 i GD1a u tretiranoj grupi ($p<0.05$). Značajnih razlika između promjena u kolokalizaciji akvaporina 2 i preostalih epitopa unutar srži bubrega nema.

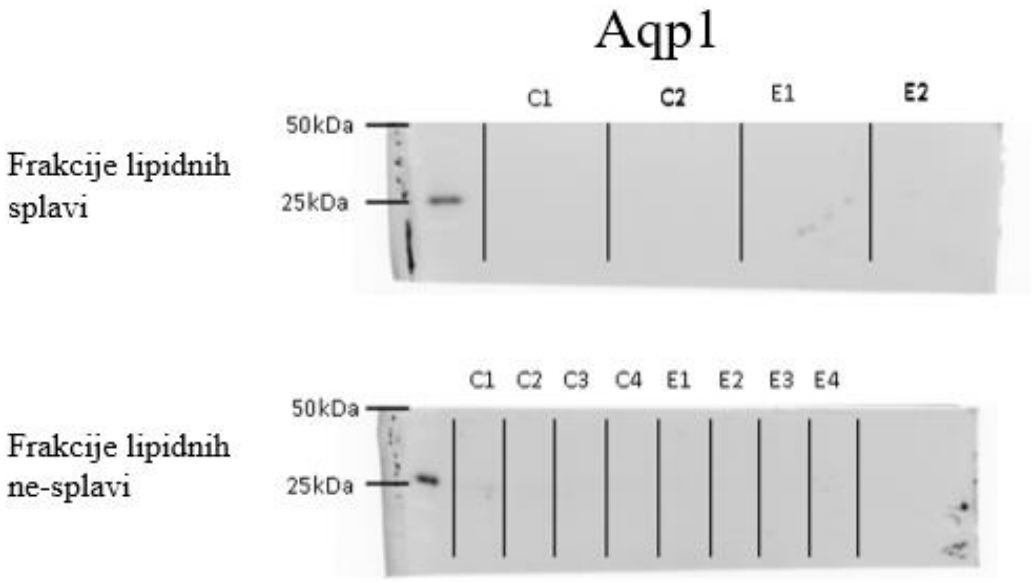
Tablica 5. Stupanj kolokalizacije aqp1 i aqp2 s flotilinom 1, transferinom i GD1a izražen kao Pearsonov koeficijent kolokalizacije.

Epitopi koji kolokaliziraju	Tkivo	Grupa životinja	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	P vrijednost
Aqp1-flot1	Kora	K	0,3483	0,1673	0,746
		GD	0,2824	0,3584	
	Srž	K	0,4392	0,1913	0,041
		GD	0,2264	0,1370	
Aqp1-trf	Kora	K	0,3051	0,1462	0,789
		GD	0,2832	0,1426	
	Srž	K	0,4191	0,1685	0,053
		GD	0,2427	0,1995	
Aqp1-GD1a	Kora	K	0,4318	0,1349	0,228
		GD	0,3124	0,1928	
	Srž	K	0,3226	0,1511	0,042
		GD	0,1731	0,0613	
Aqp2-flot1	Kora	K	0,4938	0,0842	0,001
		GD	0,1605	0,1294	
	Srž	K	0,4769	0,2391	0,632
		GD	0,4269	0,1082	
Aqp2-trf	Kora	K	0,4034	0,1351	0,046
		GD	0,2932	0,0876	
	Srž	K	0,3571	0,2509	0,878
		GD	0,3480	0,1286	
Aqp2-GD1a	Kora	K	0,6997	0,1263	0,429
		GD	0,6573	0,0422	
	Srž	K	0,6504	0,1620	0,086
		GD	0,7780	0,0620	

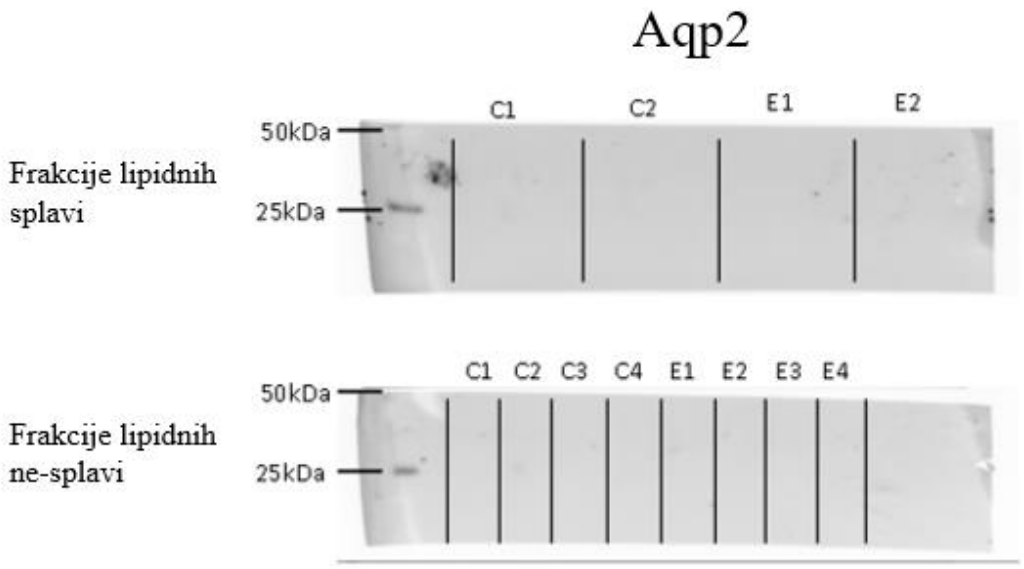
Legenda: aqp1- akvaporin, flot1- flotilin 1, trf-transferin, aqp2- akvaporin 2, K- kontrolna grupa životinja, GD – eksperimentalna grupa životinja (Gaucherov model), P vrijednost- Pearsonov koeficijent

5.6. Western blot analiza lipidnih splavi kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Western blot analizom aqp1 trebala su se dobiti dva benda, jedan oko 28 kDa koji predstavlja ne glikoziliranu formu proteina i drugi bend molekularne težine 35-50 kDa koji predstavlja glikoziliranu podjedinicu aqp1. Western blot analiza za aqp2 trebala je pokazivati bend za glikoziliranu podjedinicu aqp2 identične težine kao i glikozilirana podjedinica aqp1 (35-50 kDa) i ne glikoziliranu podjedinicu molekularne težine 29 kDa. Pretpostavljamo da rezultati Western blot analize ovog istraživanja nisu uspjeli zbog toga što protutijela daju preslab signal.



Slika 13. Akvaporin 1 u lipidnim splavima i ne-splavima, nema vidljive reakcije unutar frakcija splavi i ne-splavi na akvaporin 1. Western blot tehnika nije uspjela.



Slika 14. Akvaporin 2 u lipidnim splavima i ne-splavima, nema vidljive reakcije unutar frakcija splavi i ne-splavi na akvaporin 1. Western blot tehnika nije uspjela.

6. RASPRAVA

Istraživanja dokazuju kako jedna doza KBE uzrokuje minimalnu aktivnost GBE enzima dan nakon injekcije (<20% ref. vrijednosti) , ali treći i četvrti dan nakon tretiranja s KBE-om aktivnost enzima vratila se na 40-50% referentne vrijednosti. Rezultati pokazuju da je minimalna koncentracija KBE potrebna za povećanje koncentracije GlcCer-a u tkivima i konačno njegovo nakupljanje 100 mg/kg. Kada je KBE injektiran u miševima svaki dan u periodu od 3 tjedna, te kada se nakon tretmana gledalo koliko dana će biti potrebno kako bi se vrijednosti GlcCer-a i GBE-a vratile unutar referentnih vrijednosti, vrijednosti GlcCera-a počele su se snižavati 2 do 4 dana nakon zadnje injekcije. Nakon 12 dana vrijednosti eksperimalne grupe bile su iste onima u kontrolnoj grupi. Dokazano je i kako se aktivnost KBE snižava u svim tkivima ali ne u istoj mjeri, vrijednosti su bile puno niže u mozgu u odnosu na vrijednosti u jetri i slezeni. Miševi tretrani KBE-om svaki drugi dan pokazuju snižene vrijednosti GCE enzima ali ne dolazi do akumulacije GlcCer-a, ovo se vidi i kod ljudi koji su heterozigoti za Gaucherovu bolest. (23).

U ovom istraživanju 4 su miša tretirana s KBE-om i predstavljaju eksperimentalnu grupu životinja. Istraživanjem su dokazane snižene koncetracije aqp1 i aqp2 te flotilina 1 u srži i kori eksperimentalih životinja. Zapažene su značajne razlike između koncentracije aqp1, aqp2, flotilina 1, transferina i GD1a u srži i kori bubrega. Vrijednosti su za skoro svaki receptor snižene kod eksperimentalnih u odnosu na kontrolne životinje, a najveća razlika između srži i kore bubrega eksperimentalnih životinja nađena je kod flotilina 1 (aritmetička sredina kore =$8,5x10^6$, aritmetička sredina srži =$1,4x10^7$).

Bojenje bubrežnog tkiva hemalaun eozinom omogućuje određivanje staničnih karakteristika i tip upale ali ne omogućuje točno razlikovanje ekstracelularnog matriksa od citoplazme pa se umjesto njega često koriste PTAH ili PAS bojenje. (24). Istraživanjem nije dokazana promjena morfologije bubrega, ali je bojanje kore bubrega hemalaun eozinom pokazalo eozinofilnije obojenje eksperimentalne grupe što može upućivati na nakupljanje proteina unutar citoplazme stanica. Osim hemalaun eozin bojenje, PTAH bojenjem uočeni su difuznije definirani glomeruli te intenzivnije plavičasto obojenje koje je karakteristično za bojanje mitohondrija ovom tehnikom. Akvaporini imaju funkciju na unutrašnjoj membrani mitohondrija, a istraživanjem je dokazana ekspresija akvaporina u mitohondrijskoj membrani jetre i bubrega. Postoji velika razlika između tipova akvaporina na membrani mitohondrija,

aqp8 pokazuje veliku permeabilnost za vodu za razliku od aqp1 koji je puno manje propustan (25). Iako postoji poveznica između mitohondrija i akvaporina, ovim istraživanjem nije dokazano utječe li količina aqp1 na jače obojenje mitohondrija. Također, nismo uspjeli dokazati je li promjena količine aqp1 povezana s promjenama funkcije mitohondrija.

Istraživanje iz 1996. implicira kako snižene vrijednosti aqp1 i aqp2 imaju ulogu u stvaranju cista na bubrezima, u istraživanju su aqp1 i aqp2 imali najviše vrijednosti u tkivu kontolnih ljudskih bubrega, niže vrijednosti u tkivu bubrega fetusa, a najniže vrijednosti u eksperimentalnoj skupina bubrega (bubrezi odraslog čovjeka oboljelog od autosomno dominantne policistične bolesti bubrega). (26). Istraživanje s miševima tretiranim cisplatinom pokazuje kako su koncentracije aqp1 snižene u srži bubrega, dok su vrijednosti u kori bubrega ostale iste kao one u kontrolnoj grupi životinja. Koncentracija aqp2 pokazuje značajno sniženje i u kori i u srži bubrega tretiranih miševa u odnosu na kontrolne miševe, snižena ekspresija aqp2 povezana je sa sniženom ekspresijom aqp2 mRNA što ukazuje kako su promjene u ekspresiji aqp2 povezane s promjenama u ekspresiji gena. Ovaj dokaz promjene ekspresije gena dodatno je potvrđen činjenicom da se na uzorcima ne primjećuje strukturno oštećenje srži bubrega. Iako snižena ekspresija akvaporina nije jedini razlog nastanka simptoma bolesti, dokazano je kako uzrokuje poliuriju izazvanu smanjenom ekspresijom transportnih kanala za vodu. (27).

Raspodjela pokazuje kako su koncentracije aqp1 u kori i srži kontrolnih životinja više nego koncentracije akvaporina 1 u kori i srži eksperimentalnih životinja. Ekspresija aqp1 unutar kore i srži eksperimentalnih životinja značajno opada dok je promjena u ekspresiji aqp2 zamjetna samo u kori bubrega te također pada u eksperimentalnih životinja ($p<0,05$). . Zapažene su značajne razlike između koncentracije aqp1, aqp2, flotilina 1, transferina i GD1a u srži i kori bubrega kontrolnih i GD modela miševa, najveća razlika između p vrijednosti srži i kore bubrega nalazi se kod aqp2 (p vrijednost za koru je 0,884, a za srž iznosi 0,017). Aqp1 smješteni su u proksimalnim tubulima i Henleovoj petlji, dok se aqp2 nalaze u kanalima povezanim s transportom vode do epitela bubrežnih tubula. Većina istraživanja podupire dobivene rezulatate koji impliciraju na to kako se smanjenjem GBE enzima odnosno povišenjem koncentracije GlcCer-a smanjuje količina akvaporina u odnosu na kontrolne živoinje koje nisu tretirane KBE inhibitorom.

Remodeliranje stanične membrane uzrokuje gubitak različitih membranskih proteina, uključujući transferin. Sazrijevanje stanica kao što su retikulociti uzrokuju promjenu položaja

receptora za transferin i akvaporine tako što se receptor za transferin u potpunosti uklanja u egzosom i ispušta u cirkulaciju. Transferin i akvaporini djelomično kolokaliziraju na staničnoj membrani i na intracelularnim strukturama, te se zaključuje kako se oba proteina nalaze u istim endosomalnim dijelovima stanice. Proces grupiranja proteina još uvijek nije savršeno razjašnjen ali se nagađa kako je ubikvitinacija signal za pakiranje aqp1 u egzome(28). Prikazanim rezulatima vidi se kako u ovom istraživanju aqp1 i transferin ne kolokaliziraju, ali aqp2 i transferin kolokaliziraju u kori bubrega što podupire rezultate o djelomičnoj kolokalizaciji akvaporina s transferinom.

Pearsonov koeficijent korelacije predstavlja stupanj linearne povezanosti između dviju varijabli. Nedostatak ovakvoga izračuna predstavlja činjenica kako Pearsonov koeficijent korelacije jako mijenjaju ekstremne vrijednosti unutar grupe podataka. Pearsonov koeficijent računa korelaciju intenziteta piksela za dva promatrana kanala, a vrijednosti mogu biti od 1 do -1 . Kolokalizacija mjeri padaju li vrijednosti jednoga parametra dok vrijednosti drugoga rastu ili signal za oba parametra raste i pada proporcionalno jedan s drugim.

Kolokalizacijske analiza jedna je od tehnika korištena za kvantitativnu analizu fluorescentnih mikroskopskih slika. Kolokalizacija se često određuje bez statističkih podataka npr. ako je jedan od proteina obilježen probom koja fluorescira crveno a drugi protein probom koja fluorescira zeleno, kolokalizacija će se na slikama moći vidjeti u regijama koje su obojene žuto. Ako je većina slike žute boje, bez statističke analize može se zaključiti kako oba proteina kolokaliziraju (29). Istraživanjem iz 2002. godine računala se kolokalizacija aqp2 s protutijelima na kalneksin, Golgi 58K, TGN 38 i kalveolin 1. Aqp2 nisu kolokalizirali niti s ijednim od navedenih protutijela čime se može zaključiti kako se akvaporini ne nalaze u Golgijevom aparatu, endoplazmatskom retikulumu niti lizosomima. U ovom istraživanju utvrđeno je kako kolokalizacija aqp1 u srži bubrega opada značajno za flotilin 1 i transferini te Pearsonov koeficijent iznosi 0,041 za flotilin 1 i 0,042 za GD1a. Aqp2 mijenja položaj među splavima i nesplavima te se ovaj efekt očituje nakon tretmana gdje dolazi do njegovog značajnog premještanja iz frakcija splavi i smanjenja kolokalizacije s flotilinom 1($p<0.05$) i transferinskim receptorom ($p<0.05$).

U ovom istraživanju Western blot analiza nije pokazala bendove očekivane za aqp1 i aqp2. U većini tkiva Western blot analizom akvaporina 4 vide se 2 benda, oba benda nalaze se oko 35 i 49 kDa. Također u jetri se nalazi jak bend molekularne težine 57 kDa. Na membranama Western blota znaju se pojaviti i dodatni bendovi molekularne težine 99 i 140

kDa što upućuje na prisutnost dimera ili aqp4 agregata (30). Western blot analizom aqp1 na membrani se prikazuju dva benda, jedan 28 kDa koji predstavlja ne glikoziliranu formu proteina i drugi bend oko 35-50 kDa koji predstavlja glikoziliranu podjedinicu aqp1. Nedostatak benda glikozilirane podjedinice aqp1 u fetalnom tkivu bubrega vjerojatno je povezan sa sniženom koncentracijom proteina u tkivu. Analizom aqp2 također nastaju dva benda jedan na 29 kDa a drugi oko 35-50 kDa. Bend na 29 kDa koji predstavlja ne glikoziliranu podjedinicu aqp2 pokazuje visoku ekspresiju na membranama, za razliku od glikozilirane podjedinice (35-50 kDa) koja je u fetalnom tkivu bubrega jako slabog intenziteta (26). Pretpostavljamo kako rezultati Western blot analize ovog istraživanja nisu uspjeli zbog protutijela koji daju preslab signal.

7.ZAKLJUČAK

Iz provedenog istraživanja dobiveni su sljedeći zaključci:

- Nema vidljivih promjena u morfologiji bubrega bojenjem hemalaun eoziom, bojanje kore eksperimentalne grupe je eozinofilnije što može upućivati na nakupljanje proteina unutar citoplazme stanica
- Eksperimentalna skupina životinja ima difuznije definirane glomerule obojene PTAH metodom
- Raspodjela pokazuje kako su koncentracije akvaporina 1 u kori i srži kontrolnih životinja više nego koncentracije akvaporina 1 u kori i srži eksperimentalnih životinja.
- Nema značajnijih razlika između ekspresije GD1a i transferina u kori i srži bubrega ispitivanih skupina.
- Akvaporin 2 se premješta između splavi i nesplavi što se očituje kao smanjenje kolokalizacije s flotilinom 1 i transferinskim receptorom u bubregu Gaucherova modela.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Klasičnim histološkim bojenjima prikazati morfologiju bubrega miševa s inhibiranom razgradnjom GlcCera-a u odnosu na miševe divljeg tipa. Protutijelima na gangliozide prikazati raspodjelu gangliozida u tkivu bubrega Gaucher modela (GM) i divljeg tipa (WT). Protutijelima na flotiline vizualizirati lipidne splavi, a tranferinskim protutijelima vizualizirati ne-splavi u GM i WT. Protutijelima na akvaporine (aqp1, aqp2, mSglt1, mSglt2) odrediti položaj akvaporina u bubrezima GM i WT. Western blot analizom utvrditi sastav lipidnih splavi u GM i WT

Nacrt studije: studija je ustojena kao istraživanje parova

Materijali i metode: Istraživanje obuhvaća arhivski materijal bubrega koji se uzeo žrtvovanjem osam životinja:, četiri eksperimentalna miša tretirana s inhibitorom konduritolom b epoksidom da bi se dobio model Gaucherove bolesti i četiri netretirana miša. Svih osam životinja bilo je soja C57black/6. Netretirani miševi predstavljaju kontolnu, a tretirani eksperimentalnu skupinu. Životinje su uzgojene i žrtvovane u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek u sklopu HRZZ projekta (IP-2014-09-2324). Za studiju je dobiveno etičko dopuštenje Ministrstva poljoprivrede RH (Broj: 525-61-07-18-01)

Rezultati: Ekspresija akvaporina 1 unutar kore ($p= 0,025$) i srži ($p= 0,008$) eksperimentalnih životinja značajno opada dok je promjena u ekspresiji akvaporina 2 zamjetna samo u kori bubrega te također pada kod eksperimentalnih životinja ($p<0.05$). Razine flotilina 1 u eksperimentalnoj skupini u kori i srži su u značajnom padu i prate pad akvaporina 1. Nisu ustanovljene razlike između kore i srži kontolnih i eksperimentalnih životinja za transferin i GD1a.

Zaključak: Nema vidljivih promjena u morfologiji bubrega bojenjem hemalaun eoziom. Raspodjela pokazuje kako su koncentracije akvaporina 1 u kori i srži kontrolnih životinja više nego koncentracije akvaporina 1 u kori i srži eksperimentalnih životinja. Nema značajnijih razlika između ekspresije GD1a i transferina u kori i srži bubrega ispitivanih skupina.

Ključne riječi: Gaucher Disease , GBA, GlcCer, KBE

9. SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to compare kidney morphology of mice with inhibited degradation of GlcCer in regard to wild-type mice by using histological staining. By using antibodies to ganglioside we will try to display the distribution of ganglioside in the kidney tissue of Gaucher model and wild-type. By using antibodies to flotillin and transferrin we want to visualize rafts and non rafts in GM and WT. Using antibodies to aquaporin the aim is to determine the location of aquaporins in the kidney of wild-type and Gaucher model. To determine the components of lipid rafts in GM and WT, we will use Western blot analysis.

Study design: The study was conducted as a pair study

Materials and methods: Study included kidney tissue taken from 8 animals, 4 experimental mice treated with Conduritol B epoxide Inhibitor to get GM and 4 wild-type. All animals were C57black/6. The animals were bred and sacrificed at the Vivarium of the Faculty of Medicine as part of the HRZZ project. Ethical permission for the studies was received from the Ministry of Agriculture of the Republic of Croatia.

Results: The expression of aquaporin 1 within the cortex ($p = 0.025$) and the core ($p = 0.008$) of the experimental animals decreased significantly, while the change in the expression of aquaporin 2 was noticeable only in the kidney cortex and decreased in the experimental animals ($p < 0.05$). Flotillin 1 levels in the cortex and core of experimental group were significantly decreased and accompanied by a decrease in aquaporin 1. No differences were observed between the cortex and the core of the control and experimental animals for transferrin and GD1a.

Conclusion: There are no significant differences between the morphology of kidney in hemalaun eosin staining. The distribution of aquaporin 1 in core and cortex of experimental and control animals shows that the concentrations of aquaporin 1 is higher in the cortex and core of control animals. There are no differences between cortex and kidney core in GD1a and transferin expression.

Key words: Gaucher Disease , GBA; GlcCer, KBE

10. LITERATURA

1. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C i sur. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. International Journal of Molecular Sciences 2017;18:441-471

2. Riboldi GM, Di Fonzo AB. GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. Cells 2019;8:364

3. Rothaug M, Zunke F, Mazzullin J.R, Schweizer M, Altmeppen H, Lullmann-Rauch R i sur. LIMP-2 expression is critical for β-glucocerebrosidase activity and α-synuclein clearance. PNAS 2014; 43: 15573-15578

4. Linari S, Castaman G. Clinical manifestations and management of Gaucher disease. Clin Cases Miner Bone Metab. 2012(2); 157–164

5. Cappellini MD. A Rare Condition in Haematological Practice – Gaucher Disease. European Oncology & Haematology, 2015;11(1):15–20

6. Goker-Alpan O. Optimal therapy in Gaucher disease. Ther Clin Risk Manag. 2010;6:315-323

7. Kuo CL, Kallemeijn WW, Lelieveld LT, Mirzaian M, Zoutendijk I, Vardi A i sur. In vivo inactivation of glycosidases by conduritol B epoxide and cyclophellitol as revealed by activity-based protein profiling. The Febs Journal 2019; 584-600

8. Scott CR, Pastores G, Andersson H, Charrow J, Kaplan P, Kolodny E i sur. The clinical expression of Gaucher disease correlates with genotype: Data from 570 patients. Genetics in Medicine, 2000;2: 65-70

9. Farfel-Becker T, Vitner EB, Futerman AH. Animal models for Gaucher disease research. Dis Model Mech 2011;6:746-752

10. Sun Y, Quinn B, Witte DP, Grabowski GA. Gaucher disease mouse models: point mutations at the acid ß-glucosidase locus combined with low-level prosaposin expression lead to disease variants. Journal of Lipid Research. 2005; 46: 2102-2113

11. 3.Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. Journal of Cell Science. 2005; 118:1099-1102

12. Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. Journal of Cell Science 2005;118:1099-1102

13. Fuller M. Sphingolipids: the nexus between Gaucher disease and insulin resistance. Lipids in Health and Disease 2010;9:113

14. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. J Clin Invest 2002;110:597-603

15. Hein LK, Rozaklis T, Adams MK, Hopwood JJ, Karageorgos L. Lipid composition of microdomains is altered in neuronopathic Gaucher disease sheep brain and spleen. Mol Genet Metab 2017;121:259-270

16. Schweitzer K, Li E, Sidhaye V, Leitch V, Kuznetsov S, King LS. Accumulation od aquaporin-1- during hemolysin-induced nerotic cell death. Cellular and molecular biology letters. 2007;13:195-211

17. Futerman AH, Zimran A. Gaucher disease. 1.izd. New York. Taylor and Francis Group. 2007.

18. Lu QL, Partridge TA. A new blocking method for application of murine monoclonal antibody to mouse tissue sections. 1998; 46: 977-984

19. Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. 2005: 46:1061-1067

20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.1976; 72, 248-254

21. Rickwood D, Hames BD. Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach. 2.izdanje. Oxford University Press. 1982.

22. Mahmood T, Ping-Chang Y. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N Am J Med Sci. 2012; 4: 429-434

23. Stephens, M. C., Bernatsky, A., Burachinsky, V., Legler, G., & Kanfer, J. N. (1978). The Gaucher mouse: Differential actions of conduritl B epoxide and reversibility of its effects. Journal of Neurochemistry:1978; 30(5), 1023–1027.

24. Agarwal SK, Sethi S, Dinda AK. Basics of kidney biopsy: A nephrologist's perspective. Indian J Nephrol. 2014; 23(4): 243-252

25. Ikaga, R., Namekata, I., Kotiadis, V. N., Ogawa, H., Duchen, M. R., Tanaka, H., Iida-Tanaka, N. Knockdown of aquaporin-8 induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 cells. Biochemistry and Biophysics Reports; 2015; (4): 187–195.

26. Devuyst, O., Burrow, C. R., Smith, B. L., Agre, P., Knepper, M. A., & Wilson, P. D. Expression of aquaporins-1 and -2 during nephrogenesis and in autosomal dominant polycystic kidney disease. American Journal of Physiology-Renal Physiology:1996; 271(1), F169–F183.

27. Kishore BK, Krane CM, Di Lulio D, Menon AG, Cacini W. Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria. Kidney International, 2000; 20: 701–711

28. Blanc, L., Liu, J., Vidal, M., Chasis, J. A., An, X., & Mohandas, N. The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume. Blood; 2009: 114(18), 3928–3934.

29. Taylor, A. B., Ioannou, M. S., Aaron, J., & Chew, T.-L. Model-free quantification and visualization of colocalization in fluorescence images. Cytometry Part A:2018: 93(5), 504–516

30. Cutler, C. P., Harmon, S., Walsh, J., & Burch, K. Characterization of Aquaporin 4 Protein Expression and Localization in Tissues of the Dogfish (Squalus acanthias). Frontiers in Physiology. 2012; 3.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Karla Kegalj
Datum rođenja: 01.09.1995.
Mjesto rođenja: Osijek
Adrasa stanovanja: Antuna Kanižlića 11 Osijek
Telefon: 099 307 7320
e-mail: kegalj.karla@gmail.com
OIB: 43561460533

OBRAZOVANJE:

2010. – 2014. – II gimnazija Osijek
2014. – 2017. – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku: Medicinsko laboratorijska dijagnostika, preddiplomski sveučilišni studij
2017. - 2019. - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku- Medicinski fakultet Osijek, diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

DODATNA EDUKACIJA:

2009. – 2010. – Lanico škola stranih jezika – učenje talijanskog jezika

VJEŠTINE:

- dobro poznavanje rada na računalu
- aktivno poznavanje engleskog jezika u govoru i pismu
-položen vozački ispit B kategorije