

# Praćenje obje podjedinice feritina u bubrezima štakora imunokemijskim metodama nove generacije: spolne i starosne razlike te utjecaj gonadektomije

---

Hlupić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:590798>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Andrea Hlupić**

**Praćenje obje podjedinice feritina u bubrezima  
štakora imunokemijskim metodama nove  
generacije: spolne i starosne razlike te utjecaj  
gonadektomije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Jedinici za molekulsku toksikologiju, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Petre Turčić i suvoditeljstvom dr. sc. Marije Ljubojević, višeg znanstvenog suradnika, u sklopu istraživanja vezanih za projekt Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) AGEMETAR, IP-11-2013-1481.

*Zahvaljujem svojim mentoricama, doc. dr. sc. Petri Turčić i dr. sc. Mariji Ljubojević na uloženoj trudu i vremenu, svim korisnim savjetima i strpljenju koje su pokazale za vrijeme izrade ovog rada. Zahvaljujem i svim članovima Jedinice za molekulsku toksikologiju koji su na bilo koji način doprinijeli u izradi rada.*

*Hvala mojim najdražim kolegicama Mariji i Matei na podršci tijekom svih godina studiranja i hvala što sam uvijek mogla računati na vas. Hvala i svim ostalim prijateljima i kolegama na svim novim prijateljstvima i lijepim uspomjenama i jer je uz vas bilo lakše studirati. Najveća zahvala mojoj obitelji što su mi omogućili sve jer bez njih bez njih ništa od ovog ne bi bilo ostvarivo.*

*Hvala Damjanu na svim ohrabrenjima koja su mi trebala tijekom studiranja i hvala što si od prvog dana tu za mene bez obzira na sve.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. OSNOVNA FIZIOLOGIJA ŽELJEZA U ORGANIZMU SISAVACA.....	2
1.1.1. Oblici željeza u organizmu .....	2
1.1.2. Apsorpcija i raspodjela željeza iz prehrane .....	3
1.1.3. Promet željeza u cirkulaciji i prijenos u tkiva i organe .....	5
1.1.4. Morfologija nefrona i fiziologija željeza u bubregu.....	9
1.1.5. Održavanje sistemske homeostaze željeza .....	12
1.2. REGULACIJA PROMETA ŽELJEZA NA RAZINI STANICE .....	14
1.3. FERITIN U ORGANIZMU .....	17
1.3.1. Struktura i uloga feritina.....	17
1.3.2. Interakcija feritina s drugim metalima, proteinima i uloga u oksidativnom stresu i starenju .....	20
1.4. RAZLIKE U SADRŽAJU ŽELJEZA S OBZIROM NA DOB I SPOL .....	23
1.5. RAZLIKE U SADRŽAJU FERITINA S OBZIROM NA DOB I SPOL .....	24
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>27</b>
3.1. OTOPINE I PUFERI .....	28
3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR .....	29
3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE .....	30
3.4. PROTUTIJELA .....	31
3.4.1. Primarna protutijela .....	31
3.4.2. Sekundarna protutijela.....	32
3.5. METODE ISTRAŽIVANJA .....	33
3.5.1. Izolacija homogenata bubrega .....	33
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina.....	33
3.5.3. SDS–elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i western analiza.....	34
3.5.4. Denzitometrijska mjerenja.....	36
3.5.5. Fiksiranje tkiva in vivo .....	36

3.5.6.	Tkivni naresci i posredna imunofluorescencija .....	37
3.5.7.	Obrada uzoraka neionskim detergentima i kuhanje u citratnom puferu pH 6.....	37
3.5.8.	Prikaz i statistička analiza podataka .....	38
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>39</b>
4.1.	KARAKTERIZACIJA PROTUTIJELA RAZVIJENIH PROTIV LAKOG I TEŠKOG LANCA FERITINA.....	40
4.2.	WESTERN ANALIZA EKSPRESIJE OBIJU PODJEDINICA FERITINA U BUBREGU S OBZIROM NA SPOL I DOB.....	44
4.3.	UTJECAJ GONADEKTOMIJE NA EKSPRESIJU TEŠKE I LAKE PODJEDINICE FERITINA U BUBREGU ŠTAKORA .....	47
4.4.	IMUNOHISTOKEMIJSKI PRIKAZ JAČINE I RASPODJELE OBOJENJA TEŠKE I LAKE PODJEDINICE FERITINA U BUBREGU S OBZIROM NA DOB I SPOL ŠTAKORA.....	50
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS KRATICA</b>	
<b>10.</b>	<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

## **1. UVOD**

Željezo je esencijalan prijelazni metal neophodan u procesima vezanja i prometu kisika, prisutan u svim tkivima kao dio brojnih enzima i proteina s važnom ulogom u različitim staničnim procesima. Istovremeno, potencijalno je toksičan zbog sudjelovanja u reakcijama čiji su produkti štetni reaktivni kisikovi spojevi. Sve stanice zbog toga moraju imati precizno reguliran sadržaj raspoloživog željeza. Feritini su važne proteinske molekule koje sudjeluju u detoksifikaciji i skladištenju željeza, osiguravaju kontrolirano otpuštanje metala za različite enzimske reakcije te sudjeluju u prevenciji toksičnih učinaka slobodnog željeza (Finazzi i Arosio, 2014).

Metabolizam i homeostaza željeza vrlo je aktivno područje istraživanja, o čemu najbolje govori velik broj radova do sada objavljenih na temu željeza (više od 225. 000) i feritina (više od 33.000) (do listopada 2020, [www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)). Struktura feritina poznata je od 1937.g, kada je prvi put pročišćen kristalizacijom iz kadmijevih soli, a smatra se jednom od najvažnijih molekula u homeostazi željeza u organizmu (Arosio i sur., 2009). Na važnost uloge feritina ukazuje njegov visoko konzervirani aminokiselinski sastav u svim organizmima, a feritini su jedni od najbolje proučenih hetromultimernih, biomineralizacijskih proteina i idealne su mete za primjenu u biotehnologiji. Sposobnost feritina da sekvstrira fosfate u svojoj srži zajedno sa željezom čini ga važnim u industrijskom pročišćavanju vode, a danas se feritin intenzivno istražuje kao potencijalni vektor za ciljanu dostavu lijekova ili razvoj cjepiva (He i Marles-Wright, 2015).

Na postojanje razlika u metabolizmu željeza u ovisnosti o spolu ukazali su već 1937.g. Otis i Smith. Desetak godina kasnije Widdowson i McChance (1948, 1953) potvrdili su ove razlike u korist ženki, te zaključili kako se radi o prilagodbi ženskog organizma na stvaranje potomaka i kako je ova razlika uvjetovana spolnim hormonima. Akumulaciju željeza u organizmu ovisno o dobi opisao je Massie, 1983.g., a tijekom kasnijih godina potvrđena je povezanost akumulacije željeza s pojačanom osjetljivošću stanice na oksidativni stres (Garner i sur., 1998). Akumulaciju željeza u organizmu prati pojačana sinteza feritina, a poremećaji regulacije sinteze feritina rezultirali bi povećanom količinom slobodnog željeza. Nevezano željezo snažan je katalizator u reakcijama stvaranja slobodnih radikala koji su glavni uzročnici oksidativnog stresa, a pokazali su se važnim faktorima u teoriji starenja i patofiziologiji brojnih bolesti i stanja.

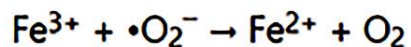
## 1.1. OSNOVNA FIZIOLOGIJA ŽELJEZA U ORGANIZMU SISAVACA

### 1.1.1. Oblici željeza u organizmu

Željezo jest najzastupljeniji prijelazni metal u organizmu sisavaca, a nalazimo ga u dva oksidativna stanja, Fe (II) ( $\text{Fe}^{2+}$ , fero-oblik) i Fe (III) ( $\text{Fe}^{3+}$ , feri-oblik). Njegova sposobnost da cirkulira između ta dva, relativno stabilna stanja, čini ga važnim kofaktorom u velikom broju temeljnih bioloških procesa, primjerice u lancu prijenosa elektrona u mitohondrijima, u transportu i pohrani kisika u formi porfirinske grupe hemoglobina i mioglobina, sintezi DNA, metabolizmu lipida i brojnim drugim. Željezo je u organizmu gotovo uvijek vezano za proteine koji ga prenose, skladište ili koriste za metaboličke i enzimske reakcije. Nevezano Fe (II) u vodenim otopinama ulazi u Fentonovu reakciju pri čemu otpuštanjem elektrona prelazi u Fe (III) željezo i katalizira formiranje toksičnih reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species, ROS), koji oštećuju biomolekule, odnosno molekule DNA, proteine i lipidne membrane. Nastalo trovalentno željezo u lagano kiselom, reduktivnom okolišu, najčešće mitohondrija ili autofagosomalno - lizosomalnog puta, vrlo lako reagira sa superoksidnim anionom, koji većinom nastaje u mitohondrijskom elektronskom lancu, a brzo prolazi sve barijere (Swaminathan, 2018). Do stvaranja superoksidnog radikala dovodi djelomična redukcija molekulskog kisika, koji se u velikoj mjeri vrlo brzo pretvara u vodikov peroksid uz enzim superoksid dismutazu (*engl.* superoxide dismutase, SOD). Međutim, dio superoksidnih iona sudjeluje u Haber-Weiss-ovoj reakciji u stanici, pri čemu superoksidni ion reducira trovalentno željezo i ponovno ga sprema za potencijalnu kaskadnu reakciju oksidacije u kojoj iz vodikovog peroksida nastaje hidroksilni radikal kao najveći pokretač oksidativnog stresa u stanici (slika 1.). Ova ciklička reakcija katalizirana je upravo velikim redoks potencijalom slobodnog željeza, a zbog njegove snažne reaktivnosti, vrlo malo povećanje količine slobodnog željeza u organizmu može dovesti do kaskadne reakcije stvaranja ROS (Bou Abdallah, 2010). Radi potencijalne toksičnosti željeza, njegov sadržaj u stanici mora biti precizno reguliran kako bi se osigurale dovoljne količine za sve nužne procese, ali spriječile moguće toksične reakcije (Anderson i Frazer, 2017).



**1. korak: redukcija željeza**



*Haber-Weiss-ova reakcija*

**2. korak : formiranje visoko reaktivnog hidroksilnog radikala**



*Fentonova reakcija*

**Suma reakcija:**



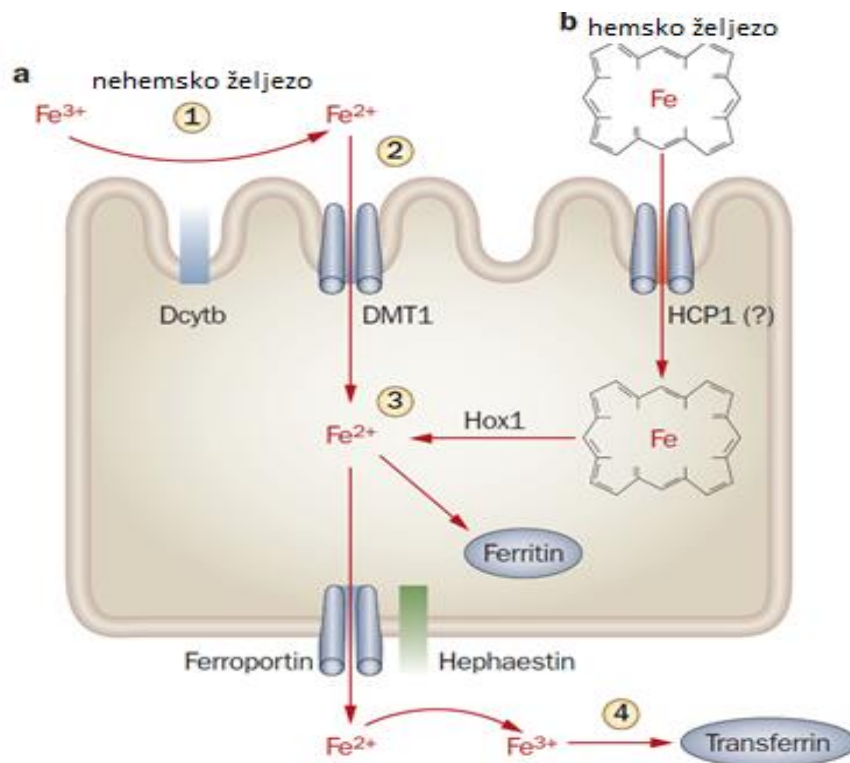
**Slika 1.** Nastajanje toksičnih reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species, ROS) djelovanjem slobodnog željeza (Swaminathan, 2018)

### 1.1.2. Apsorpcija i raspodjela željeza iz prehrane

Ukoliko zanemarimo željezo koje se uzima u terapijske svrhe, nakon začeca i protoka svih tvari kroz placentu prema fetusu, rođenjem željezo u organizam ulazi isključivo putem hrane. Željezo iz prehrane dijelimo na hemsko željezo i nehemsko željezo. Hemsko željezo je željezo koje se nalazi u kompleksu s molekulom protoporfirina IX te zajedno s njim čini molekulu hema. Većina henskog željeza porijeklom je iz životinjskog hemoglobina i mioglobina. Nehemsko željezo nalazimo u više različitih oblika, a oni uključuju slobodno željezo, željezo u obliku kompleksa niske molekularne mase, željezo pohranjeno u feritinu i željezo u katalitičkom centru velikog broja drugih proteina. Budući da je hemsko željezo unutar kompleksa, njegova je apsorpcija manje ovisna o sastavu prehrane zbog čega se učinkovitije apsorbira. Točan proces apsorpcije henskog željeza ne zna se u potpunosti, ali pretpostavlja se da se najprije hem veže za receptor HCP1 (*engl.* heme carrier protein 1) na četkastom epitelu tankog crijeva, nakon čega se procesom endocitoze unosi u stanicu (Anderson i Frazer, 2017; Stein i sur., 2010). Nehemsko željezo najčešće u Fe (III) feri-obliku stvara netopljive okside, hidrokside i druge teško topljive soli u vodenim otopinama, zbog čega se teže apsorbira (Linder, 2013). Nizak pH želuca i proksimalnog dijela tankog crijeva ipak održava nehemsko željezo u topljivom obliku. Apsorpcija nehenskog željeza podložna je utjecaju ostalih sastavnica prehrane pa ga tako male organske kiseline, poput askorbinske ili limunske, mogu reducirati u fero-oblik i olakšati

apsorpciju. S druge strane, spojevi biljnog porijekla, poput polifenola, fitata i tanina mogu vezati nehemske željezo i smanjiti njegovu apsorpciju (Anderson i Frazer, 2017).

Prilikom transporta iz lumena gastrointestinalnog trakta (GIT) u cirkulaciju, željezo prolazi dvije membrane, apikalnu, četkastu membranu enterocita, koja se nalazi s luminalne strane i bazolateralnu membranu enterocita. Najveći dio apsorpcije nehenskog željeza odvija se putem DMT1 (*engl.* divalent metal transporter 1) transportera koji se nalazi na apikalnoj membrani enterocita. Supstrat za DMT1 je Fe (II), fero-oblik željeza, a budući da je većina željeza u prehrani u Fe (III) feri-obliku, ono prethodno mora biti reducirano. Redukciju željeza na apikalnoj membrani enterocita obavlja duodenalna citokrom B reduktaza (DcytB), ali moguće i druge reduktaze. Nakon ulaska u enterocite, sudbina željeza ovisi o potrebama stanice i organizma. Ukoliko je u organizmu uskladištena dovoljna količina željeza, željezo će se skladištiti unutar enterocita u skladišnom proteinu feritinu. S druge strane, ako su zalihe željeza u organizmu niske, ono će se odmah nakon ulaska u enterocite transportirati kroz citoplazmu do bazolateralne membrane gdje će djelovanjem transportera feroportina (FPN1) biti prebačeno u cirkulaciju. Transportirano željezo u fero-obliku kroz FPN1 preko bazolateralne membrane dočekuje oksidaza hephaestin, koja prevodi željezo iz Fe (II) u Fe (III), dok tu ulogu u većini ostalih stanica obavlja homolog hephaestina, ceruloplazmin (slika 2.). Time se željezu omogućava daljnji transport u Fe (III) feri-obliku koji nije reaktivan, a vezan najčešće na transferin, ali i druge proteine plazme kojima se prenosi, ne precipitira s organskim spojevima u cirkulaciji (Anderson i Frazer, 2017; Muckenthaler i sur., 2017; Stein i sur., 2010).

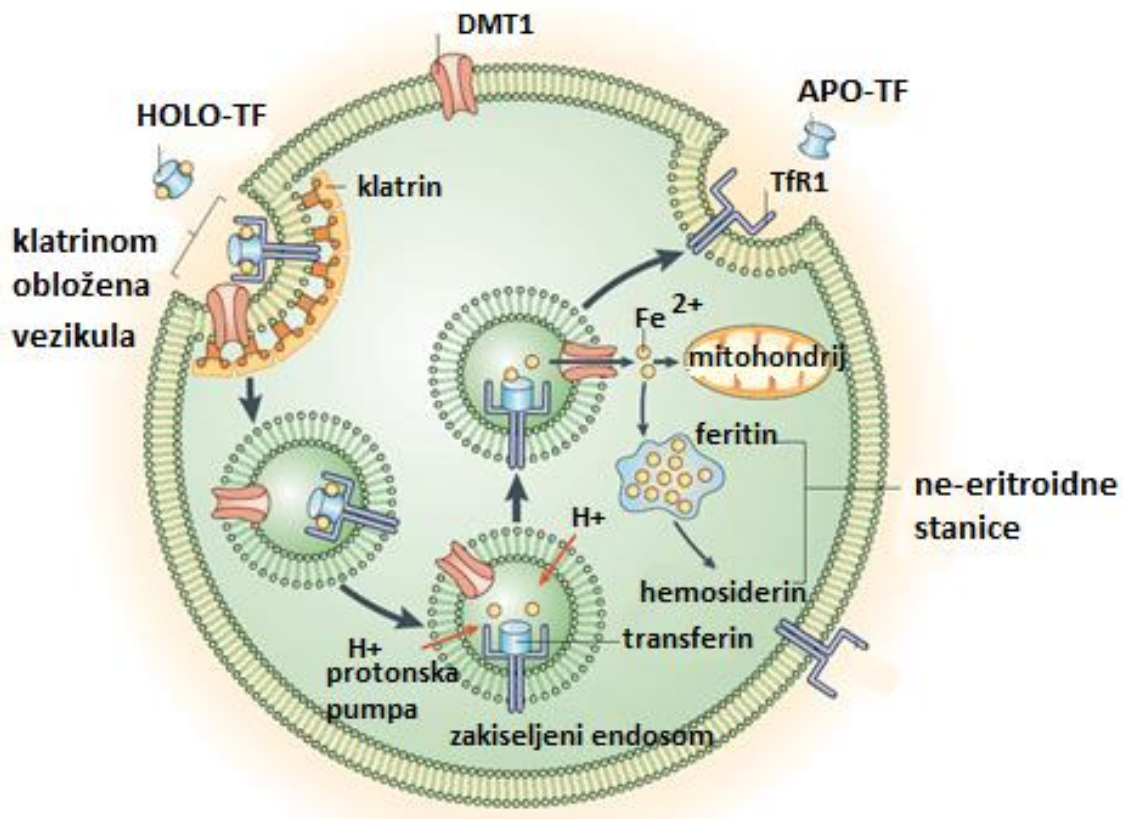


**Slika 2.** Mehanizam apsorpcije željeza kroz crijevni epitel (Stein i sur., 2010)

### 1.1.3. Promet željeza u cirkulaciji i prijenos u tkiva i organe

Željezo apsorbirano u cirkulaciju veže se za plazmatski glikoprotein porijeklom iz jetre, transferin (Tf), koji ima dva visoko afinitetna mjesta za molekule Fe (III). U kompleksu Tf-Fe<sub>2</sub>, željezo cirkulira kroz organizam u obliku koji je raspoloživ stanicama i tkivima za metaboličke potrebe, ali bez štetnih učinaka uzrokovanih formiranjem ROS. U fiziološkim uvjetima tek je oko 30 % ukupnog sadržaja transferina zasićeno željezom, čime se osigurava dovoljno slobodnih molekula transferina u slučaju nagle pojave većeg priljeva željeza u cirkulaciji (Muckenthaler i sur., 2017). Gotovo sve stanice u organizmu, posebno one s velikim potrebama za željezom, na svojim membranama ekspimiraju transferinski receptor 1 (TfR1). TfR1 veže kompleks Tf-Fe<sub>2</sub> s izrazito visokim afinitetom, a s nešto nižim afinitetom Tf-Fe kompleks, kako bi se osigurala maksimalna učinkovitost procesa apsorpcije. Nakon vezanja Tf-Fe<sub>2</sub> za receptor, kompleks Tf-TfR1 internalizira se procesom klasične receptorom posredovane endocitoze u vezikulama obloženim klatrinom. Nadalje, u vezikuli koja se zakiseli V-ATPazom ili fuzionira u formu ranog endosoma, nizak pH potiče konformacijsku promjenu proteina, pri čemu se željezo odvaja

s Tf te se slobodni Fe (III) feri-oblik željeza reducira pomoću enzima iz porodice STEAP (*engl. six transmembrane epithelial antigen of prostate*) reduktaza u Fe (II). Reducirano željezo supstrat je za DMT1 na membrani endosoma preko kojeg se prenosi iz endosoma u citoplazmu. Ovisno o trenutnim potrebama stanice, željezo se dalje raspodjeljuje u organele za metaboličke procese ili pohranjuje u citoplazmi u obliku feritina. Transferin bez vezanog željeza nazivamo apotransferin (apo-Tf), a on se u obliku kompleksa s TfR1 vraća na površinu stanične membrane. Apo-Tf zatim disocira s TfR1 i vraća se u cirkulaciju, a TfR1 može ući u novi ciklus prijenosa Tf-Fe<sub>2</sub> (slika 3.) (Anderson i Frazer, 2017; Zecca i sur., 2004).



**Slika 3.** Transferinski ciklus

Transferin s vezanim željezom (holo-Tf) veže se za TfR1 i apsorbira u stanicu putem receptorom posredovane endocitoze u klatrinom obloženim vezikulama. Zakiseljavanjem vezikule u formu ranog endosoma dolazi do konformacijske promjene koja oslobađa željezo s transferina u endosom i zatim se slobodno željezo putem DMT1, nakon redukcije STEAP proteinom,

transportira u citoplazmu. Prazan transferin (apo-Tf) se, vezan za TfR1, vraća na staničnu membranu gdje se pri neutralnom pH otpušta s receptora i ponovno sudjeluje u transportu željeza (Zecca i sur., 2004).

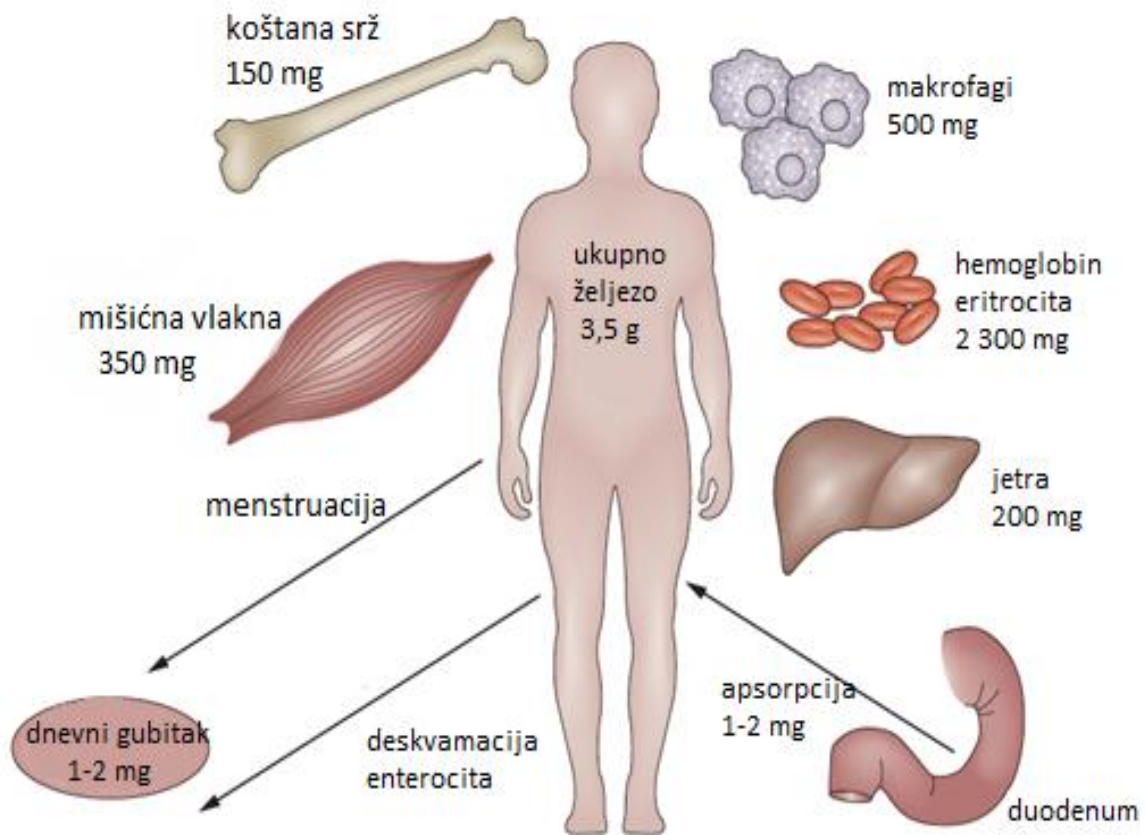
Budući da je slobodno željezo u vodenoj otopini opasno, u fiziološkim uvjetima svo željezo u cirkulaciji vezano je za Tf. Ukoliko količina željeza u plazmi premaši ukupan kapacitet vezanja Tf, koji je oko 60% zasićenosti, dolazi do pojave ne-transferinski vezanog željeza (*engl.* non-transferin bound iron, NTBI). NTBI čine oblici željeza koji su vezani za serumske proteine poput albumina, lipokalina (*engl.* neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) ili laktoferina, ali i željezo vezano za male molekule poput citrata (Thévenod i Wolff, 2015). Budući da je NTBI relativno slabo vezano i nezaštićeno, smatra se snažnim potencijalnim generatorom ROS (Nakatani i sur., 2018 ).

Željezo se cirkulacijom doprema vezano za Tf do tkiva i organa ovisno o potrebama organizma. Najviše željeza zahtijeva koštana srž, budući da neprestano sintetizira nove crvene krvne stanice (Anderson i Frazer, 2017). Potrebe koštane srži premašuju dnevnu apsorpciju željeza iz hrane, zbog čega je izuzetno važan proces recikliranja željeza iz starih eritrocita za koji su najvažniji makrofagi slezene (Muckenthaler i sur., 2017). Ukoliko je potreba za željezom toliko velika da ju recikliranje eritrocita ne može zadovoljiti, dolazi do otpuštanja željeza iz skladišta u organizmu (Anderson i Frazer, 2017 ).

Najveće skladište željeza u organizmu je jetra koja u fiziološkim uvjetima pohranjuje između 0,3 - 1 g željeza (slika 4.) (Frazer i Anderson, 2014). Jetra sadrži dvije najvažnije vrste stanica, hepatocite i Kupferove stanice. Većina apsorbiranog željeza pohranjuje se u hepatocitima u obliku feritina i oni su ključni za pohranu suvišnog željeza koje će se u slučaju potrebe moći otpuštati u cirkulaciju. Hepatociti reagiraju na ulazak željeza u stanicu povećanjem sinteze skladišnog proteina feritina (Linder i sur., 1973). Osim u hepatocitima željezo se može pohraniti i u enterocitima probavnog, odnosno gastrointestinalnog trakta (GIT), u slučaju već visokih zaliha željeza u organizmu. Tada se nakon apsorpcije u enterocite ono ne transportira u cirkulaciju, već ostaje pohranjeno u feritinu enterocita te se kroz nekoliko dana gubi fiziološkim procesom ljuštenja ostarjelih enterocita s površine GIT-a (Frazer i Anderson, 2014).

Glavni organ odgovoran za recikliranje željeza je slezena. Prosječan životni vijek eritrocita je 120 dana, a starenjem oni gube fleksibilnost zbog čega ostaju zarobljeni u tkivu slezene i fagocitirani su od strane makrofaga. Fagosom se zatim stapa s lizosomom pri čemu se eritrocit razgrađuje, hemoglobinski lanci raspadaju na aminokiseline, a željezo iz hema oslobađa iz protoporfirinskog prstena i otpušta u citoplazmu gdje ga preuzima feritin ili se izbacuje iz stanice putem FPN1. Ovaj je proces ključan za održavanje *de novo* sinteze hemoglobina (Frazer i Anderson, 2014).

Bubreg je zajedno s plućima i crijevima glavni regulator homeostaze tjelesnih tekućina, selektivno izlučujući višak tekućine, metaboličke otpade i ksenobiotike. Do nedavno se nije pridavala velika važnost ulozi bubrega u eliminaciji željeza, budući da je željezo uglavnom vezano za velike proteine, koji se ne filtriraju u urin (Thévenod i Wolff, 2015). Međutim novija istraživanja idu u prilog tomu da se transferin, iako velik (78 kDa) protein, zbog svoje izdužene konformacije filtrira kroz glomerul. Proksimalni kanalići putem proteina kubilina i megalina vežu filtrirani transferin sa željezom. Tako je u normalnim fiziološkim uvjetima renalni gubitak željeza minimalan i iznosi oko 0,7 % jer se željezo gotovo u potpunosti reapsorbira putem epitelnih stanica bubrega (Smith i Thévenod, 2008). Značajniju ulogu bubreg ipak ima u regulaciji eritropoeze kao glavni proizvođač eritropoetina, hormona koji pokreće proliferaciju eritrocita. Eritropoetin proizvode intersticijske stanice u tkivu između kanalića nefrona, koje su vjerojatno u interakciji s makrofagima. Povećanjem eritropoeze dolazi do povećanja intestinalne apsorpcije željeza i povećane mobilizacije željeza iz jetre u koštano srž kako bi se dovoljne količine osigurale za adekvatnu sintezu eritrocita (Muckenthaler i sur., 2017).



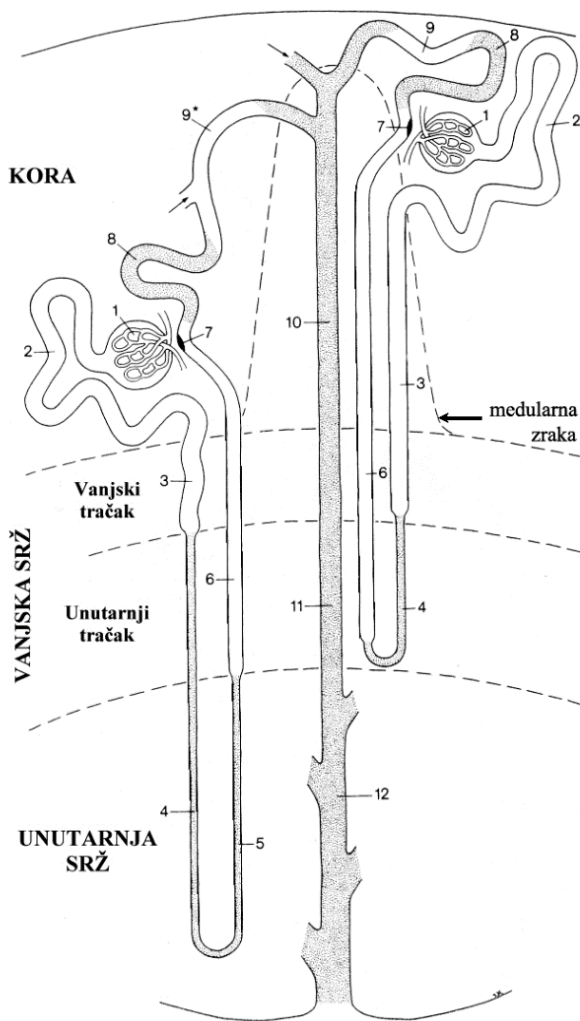
**Slika 4.** Raspodjela željeza u organizmu

Ljudski organizam sadrži približno 3,5 grama željeza. Većina željeza u organizmu nalazi se u eritrocitima u obliku hemoglobina. Oko 10% ukupnog željeza pohranjeno je u mišićnim vlaknima u obliku mioglobina, a preostala količina pohranjena je u jetri, makrofagima i koštanoj srži. Prosječno se dnevno iz organizma gubi 1-2 mg, deskvamacijom enterocita, epitelnih stanica kože ili menstruacijom, a ta količina odgovara količini koja se dnevno apsorbira iz prehrane (Stein i sur., 2010).

#### **1.1.4. Morfologija nefrona i fiziologija željeza u bubregu**

Osnovna građevna jedinica bubrega, nefron, je cjevasta struktura građena od epitelnog tkiva, a sastoji se od nekoliko međusobno povezanih segmenata karakteristične morfologije i funkcionalnih svojstava. Početni dio nefrona čini kapilarno klupko, koje nazivamo glomerul, a

na njega se nastavlja proksimalni kanalić (PK) sa svojim zavojitim segmentima S1 i S2 te ravnim dijelom S3. Na PK se nastavljaju redom, tanki silazni krak Henleove petlje (HP), tanki uzlazni krak Henleove petlje, debeli uzlazni krak Henleove petlje, makula densa, zavijeni distalni kanalić (DK), vezni kanalić, sabirni kanalić kore te sabirni kanalići (SK) vanjske i unutarnje srži. Glomerul, S1 i S2 segmenti PK, DK sa svojim savijenim i ravnim segmentima te dio SK nalaze se u kori bubrega, a dio S3 PT, HP i dio sabiruće cijevi nalazi se u srži bubrega (slika 5.) (Thévenod i Wolff, 2015).



**Slika 5.** Građa nefrona

Shema poprečnog presjeka bubrega s prikazom kortikalnog i jukstamedularnog nefrona. Kortikalan ili jukstamedularan nefron razlikuje smještaj u kori i dužina Henleove petlje. Nefron čine slijedeći odsječci: 1 glomerul; 2 zavijeni proksimalni kanalić (pars convoluta); 3 ravni



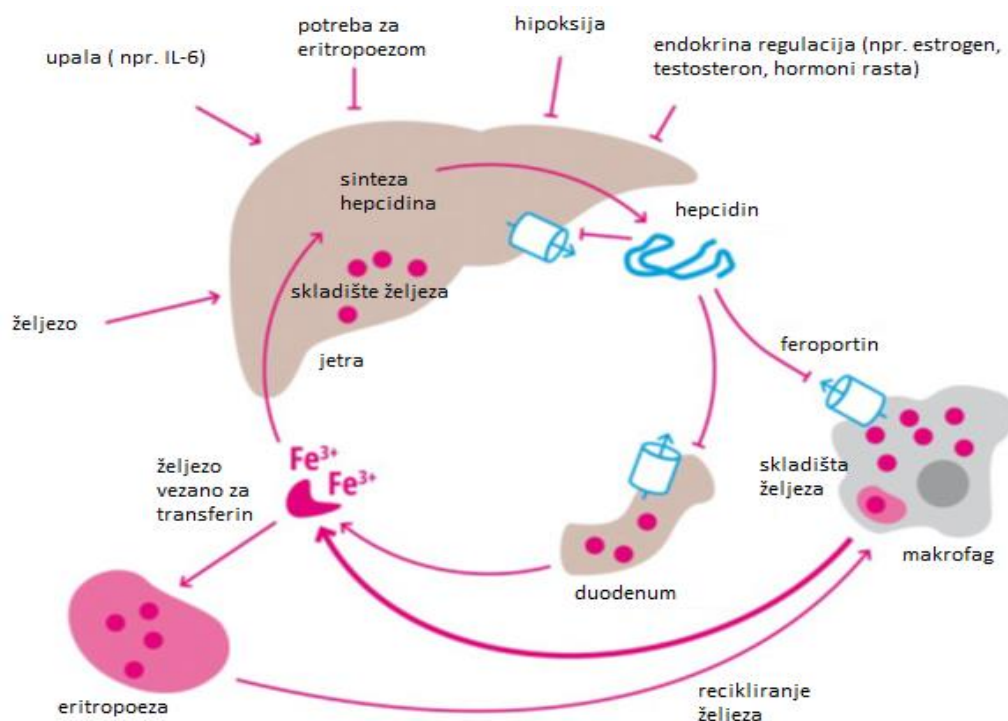
proksimalni kanalić (pars recta); 4 tanki silazni krak Henleove petlje; 5 tanki uzlazni krak Henleove petlje; 6 debeli uzlazni krak Henleove petlje; 7 makula densa; 8 zavijeni distalni kanalić; 9 vezni kanalić; 10, 11, 12 sabirni kanalić kore, te vanjske i unutarnje srži. Sabirni kanalići, uz krakove Henleove petlje, tvore unutrašnju srž (papilu) na kraju koje se otvaraju u nakapnicu bubrega (Thévenod i Wolff, 2015).

Prolaskom krvi kroz glomerul, filtrira se tekućina, otopljene tvari i proteini većinom manji od 69 kDa pri čemu nastaje primarni urin. Primarni urin sadrži organizmu važne nutrijente i elektrolite koji će prolaskom kroz sustav kanalića nefrona biti aktivno reapsorbirani, nakon čega preostaje manja količina štetnih tvari i suvišne tekućine koja se izlučuje u obliku urina. Željezo ulazi u renalni tubularni lumen vezan za proteinske nosače za koje je vezan i u plazmi, filtrira se putem glomerula i zatim gotovo u potpunosti reapsorbira endocitozom u PK i DK putem TfR1 receptora ili putem nespecifičnih receptora poput megalina i kubilina. Za reapsorpciju željeza važnu ulogu ima PK, čija je osnovna funkcija reapsorpcija aminokiselina, glukoze, bikarbonata i drugih molekula putem niza specifičnih transportera na luminalnoj četkastoj membrani epitelnih stanica nefrona. Epitelne stanice proksimalnih kanalića ekspimiraju sve proteine potrebne za promet i skladištenje željeza. Također, PK na membrani svojih stanica ima ekspimiran receptorski kompleks koji služi za prilično nespecifičnu reapsorpciju filtriranih proteina i peptida, a nazivamo ga megalin-kubilin-AMN kompleks (*engl.* megalin-cubilin-product of amnionless gene, AMN) (Thévenod i Wolff, 2015; Smith i Thévenod, 2008). Megalin je veliki transmembranski glikoprotein visoko ekspimiran na apikalnoj membrani proksimalnog tubula nefrona, a njegova je uloga reapsorpcija albumina i niskomolekularnih proteina. Kubilin je protein, također ekspimiran na apikalnoj membrani PK, zadužen za renalnu reapsorpciju filtriranih proteina poput albumina i transferina, a zbog nedostatka transmembranske domene mora se vezati za AMN protein, koji ga pravilno smješta na membranu (Nakatani i sur., 2018). Ovaj receptorski kompleks veže metaloproteine poput Tf i metalotioneina (MT) te ih reapsorbira. Budući da se brojni proteini koji vežu željezo, poput Tf, laktoferina, albumina, hemoglobina i mioglobina te mnogi drugi, u fiziološkim uvjetima filtriraju kroz glomerularni filter, izlučuju u primarni urin, nakon čega se reapsorbiraju, bubreg je neprestano izložen velikim količina štetnih tvari, koje mogu uzrokovati oštećenja nefrona i sudjelovati u patofiziologiji bolesti bubrega (Thévenod i Wolff, 2015).

### 1.1.5. Održavanje sistemske homeostaze željeza

Homeostaza željeza kod sisavaca posebna je po tome što je dominantno kontrolirana na razini intestinalne apsorpcije te što ne postoji mehanizam aktivne eliminacije željeza iz organizma (Thévenod i Wolff, 2015). Eliminacija željeza iz organizma odvija se kontroliranim procesom ljuštenja ostarjelih enterocita koji sadrže uskladišteno željezo, fiziološkim procesima poput menstrualnog krvarenja, slučajnih krvarenja, a gotovo zanemariva količina izgubi se urinom (Linder, 2013). Veliki udio željeza u organizmu vrlo se učinkovito reciklira kako bi se zadovoljili veliki zahtjevi za željezom u procesu eritropoeze, a višak se uglavnom pohranjuje u jetri. U normalnim fiziološkim uvjetima, količina izlučenog željeza je dobro uravnotežena s količinom željeza koje se unosi putem prehrane (Thévenod i Wolff, 2015).

Glavni hormon zaslužan za sistemske homeostazu željeza je mali hormon porijeklom iz jetre, hepcidin. Hepcidin je peptid od 25 aminokiselina, koji se sintetizira i izlučuje iz hepatocita, nakon čega cirkulira plazmom i filtrira se putem bubrega. Hepcidin djeluje kontrolirajući količinu FPN1 na membrani, a budući da je FPN1 jedini poznati eksportni protein koji izlučuje željezo u plazmu, interakcija hepcidina i feroportina ključna je za adekvatnu mobilizaciju željeza iz njegovih skladišta do tkiva i organa. Izravnim vezanjem hepcidina na FPN1 dolazi do njegove endocitoze i proteolize u lizosomima, što posljedično ima inhibitorni učinak na oslobađanje željeza iz stanice. Pokazalo se kako je količina željeza u organizmu snažan regulator transkripcije hepcidina, iako točan mehanizam nije poznat (Ganz, 2013). Posljedica povećane ekspresije hepcidina je smanjenje izlaska željeza iz stanica, što je posebno izraženo kod onih tipova stanica koje eksprimiraju velike količine FPN1, poput makrofaga i enterocita. Ekspresija hepcidina suprimirana je tijekom povećanih potreba za željezom, primjerice u trudnoći ili tijekom hipoksije (Frazer i Anderson, 2014). Prema tome, kada su zalihe željeza u organizmu velike, koncentracije hepcidina su visoke, a otpuštanje željeza u cirkulaciju smanjeno jer se većina pohranjuje u jetri. Kada se pojavi potreba za otpuštanjem željeza u cirkulaciju, koncentracija hepcidina se smanjuje, a ekspresija FPN1 povećava kako bi se osigurala dovoljna opskrba stanica i tkiva (slika 6.) (Anderson i Frazer, 2017).



**Slika 6.** Regulacija sistemske homeostaze željeza

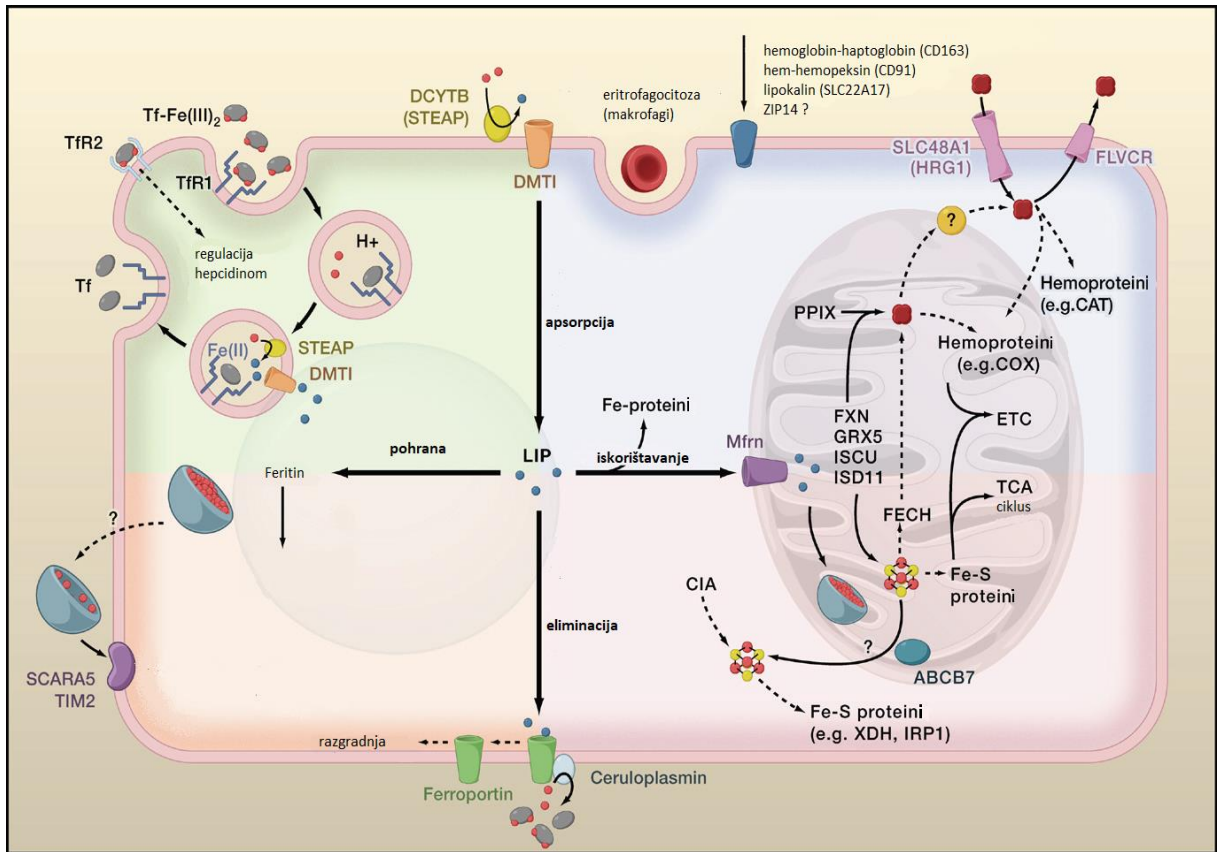
Na sintezu hepcidina utječe koncentracija željeza, upala, potreba za eritropoezom, hipoksija i endokrini podražaji. Hepcidin djeluje na ekspresiju ferroportina, koji je dominantno eksprimiran na hepatocitima, makrofagima i enterocitima, a nakon vezanja hepcidina dolazi do internalizacije i razgradnje ferroportina. Željezo vezano za transferin je glavni regulator ekspresije hepcidina u organizmu (Steinbicker i Muckenthaler, 2013).

Mehanizmi homeostaze željeza neovisni o hepcidinu uključuju hipoksiju i deficijenciju željeza u stanici. U stanju hipoksije, povećava se količina mRNA koja kodira za FPN1 zbog djelovanja inducibilnih faktora hipoksije (*engl.* hypoxia-inducible factors, HIF) posebno HIF-2 $\alpha$ , koji regulira transkripciju FPN1. Razgradnja HIF ovisna je o kisiku i željezu zbog čega koncentracija HIF-2 $\alpha$  može biti povećana uslijed hipoksije ili deficijencije željeza (Ganz, 2013). Zbog hipoksije, organizam kompenzacijskim mehanizmom pojačane eritropoeze nadoknađuje manjak kisika u tkivima. Eritropoezu regulira peptidni hormon, eritropoetin koji je porijeklom iz bubrega, a njega regulira tlak kisika u krvi. Prema tome, ako dođe do krvarenja, dolazi do pada razine kisika u krvi, čime se pojačava eritropoeza. Proces eritropoeze zahtijeva mobilizaciju većih količina željeza u koštano srž pa se zbog toga oslobađa željezo pohranjeno u feritinu,

smanjuje ekspresija hepcidina te se pojačava prisutnost FPN1 na membranama stanica i apsorpcija željeza putem enterocita (Linder, 2013).

## 1.2. REGULACIJA PROMETA ŽELJEZA NA RAZINI STANICE

Većina stanica eksprimira TfR1 te koristi Tf kao glavni prijenosnik za željezo, iako neke vrste stanica mogu koristiti i druge oblike željeza, poput NTBI, koje se apsorbira putem ZIP 14 (*engl.* Zrt (zinc-regulated transporters)/Irt (iron regulated transporter)-like protein 14). Željezo iz plazminog feritina ili hema vezanog za hemopeksin, koji nastaje u cirkulaciji hemolizom eritrocita spadaju u NTBI. Ovi su oblici željeza važni za održavanje homeostaze, ali količinski se najviše željeza ipak unosi putem Tf (Frazer i Anderson, 2014). Ulaskom u citosol stanice, željezo postaje dio citosolnog labilnog skupa željeza (*engl.* labile iron pool, LIP), koji je namijenjen za metaboličke potrebe, pohranu ili izlazak iz stanice. Budući da je slobodno željezo u citosolu kao vodenoj otopini reaktivno, nužno je da se veže za molekule i proteine koji će ograničiti njegovo toksično djelovanje. LIP predstavlja željezo koje cirkulira između staničnih proteina i odjeljaka te ono koje nije trenutno unutar enzima, citokroma, nosača kisika ili ono koje je već pohranjeno u feritinu (Linder, 2013). Iako mu sadržaj nije u potpunosti poznat, smatra se da je željezo unutar LIP-a dominantno u fero-obliku, vezano za spojeve niske molekulske mase, poput nukleotida, aminokiselina i citrata, a u najvećoj mjeri za glutation (GSH) (Philpott i Jadhav, 2018; Linder, 2013). Željezo prilikom ulaska u citosol, među ostalim vežu i intracelularni proteini pratioci (*engl.* chaperons), odnosno šaperoni, PCBP (*engl.* poly(rC)-binding proteins), koji omogućuju siguran unutarstanični transport željeza do drugih proteina i enzima (Philpott i Jadhav, 2018). Željezo je najčešće usmjereno u mitohondrije, gdje se odvija sinteza hema i Fe-S klastera. Višak unutarstaničnog željeza, koji se ne iskoristi u metaboličkim procesima pohranjuje se unutar stanice u obliku heteropolimernog proteina feritina ili ako je potrebno otpušta u cirkulaciju. Željezo je u feritinu pohranjeno u feri-obliku kao biorasploživ mineral ferihidrit koji nastaje nakon oksidacije Fe (II) enzimskom aktivnošću koju posjeduje podjedinica teškog lanca feritina (Arosio i sur., 2009). U cirkulaciju se iz stanice željezo otpušta u Fe (II) fero-obliku putem FPN1, a u krvi, odnosno plazmi, se odmah veže kao Fe (III) na transferin zbog čega mora prethodno biti oksidirano putem hephaestina ili ceruloplazmina. FPN1 je kod sisavaca dominantno eksprimiran u duodenalnim enterocitima, makrofagima i hepatocitima, odnosno stanicama koje održavaju koncentraciju željeza u plazmi (slika 7.) (Muckenthaler i sur., 2017).



**Slika 7.** Promet željeza unutar stanice

Većina stanica preuzima željezo vezano za transferin putem receptorom posredovane endocitoze (*engl.* receptor mediated endocytosis, RME). U endosomu se kompleks TfR1-Tf-Fe<sub>2</sub> razgrađuje i reducira putem STEAP reduktaza, nakon čega se putem DMT1 željezo otpušta u citosol, a receptor reciklira. Željezo apsorbirano u stanicu postaje dio labilnog skupa željeza (LIP) i koristi se za sintezu proteina, pohranjuje u feritinu ili eliminira iz stanice. Količina željeza u LIP-u određena je brzinom apsorpcije, iskorištavanja, pohrane i eliminacije. Željezo se iz stanice eliminira putem ferroportina uz naknadnu oksidaciju u Fe (III) putem hephaestina ili ceruloplazmina (Hentze i sur., 2010).

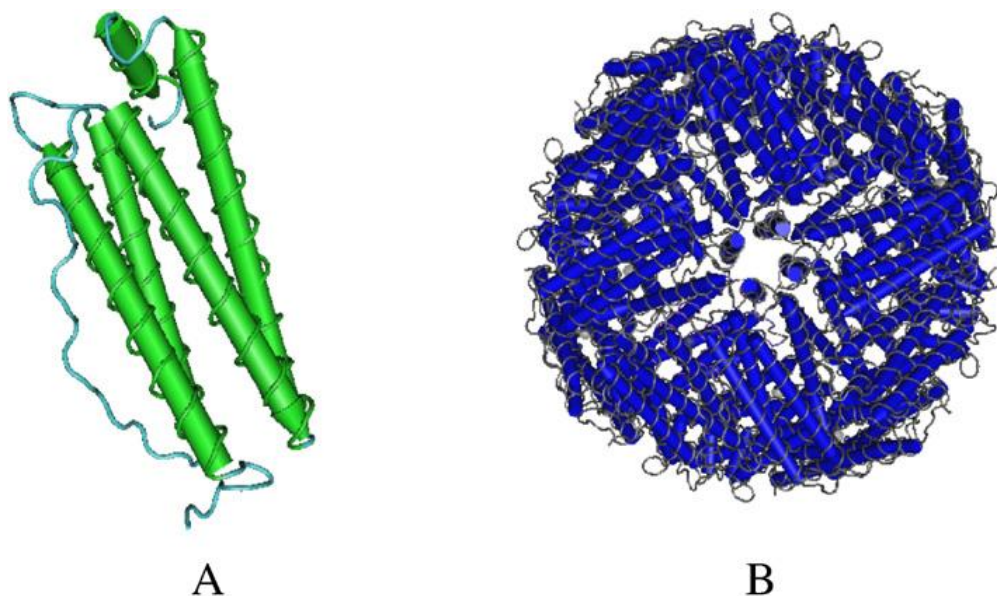
Homeostaza željeza unutar stanice precizno je regulirana kako bi se maksimalno povećao unos željeza u stanicu u slučajevima deficita, odnosno potaknula pohrana željeza u stanici kada je u njoj već dovoljna količina željeza. Regulacija apsorpcije se postiže na različitim razinama, a najbolje je objašnjena regulacija na posttranskripcijskoj razini. Na 3' netranslatiranoj regiji (*engl.* untranslated region, UTR) molekule glasničke RNA (*engl.* messenger RNA, mRNA) koja kodira za TfR1, prisutno je pet tandemskih motiva koji reagiraju na prisutnost željeza (*engl.* iron responsive elements, IRE). Za te sljedove RNA vežu se regulatorni proteini 1 i 2 (*engl.* iron regulatory proteins, IRP1 i IRP2), koji u ovisnosti o unutarstaničnom sadržaju željeza reguliraju translaciju mRNA za proteine uključene u homeostazu željeza. Pri niskim koncentracijama željeza, IRP se vežu na IRE molekule mRNA za TfR1 i osiguravaju njezinu stabilizaciju što omogućuje produljenu ekspresiju TfR1 te veću prisutnost na membrani i povećan unos Tf-vezanog željeza u stanicu. Pri visokim koncentracijama željeza u stanici IRP zauzimaju konformaciju koja ne može vezati mRNA, zbog čega je mRNA receptora za transferin dostupna staničnim endonukleazama za razgradnju. Osim mRNA za TfR1, translacija feritinske mRNA također je regulirana sadržajem željeza i IRP molekulama. Feritinska mRNA ima jedan IRE na 5' UTR, na koju se u uvjetima niske koncentracije željeza u stanici veže IRP koji pak blokira translaciju mRNA, čime se posljedično smanjuje koncentracija feritina u stanici. Kada je koncentracija željeza u stanici visoka, IRP nije vezan za mRNA već je takva mRNA dostupna za translaciju što osigurava sintezu dovoljnih količina feritina u stanici za pohranu željeza. Budući da se ovi procesi odvijaju istovremeno, stanica ima precizan paralelan mehanizam regulacije sinteze glavnih proteina uključenih u transport i skladištenje željeza (Frazer i Anderson, 2014).

### 1.3. FERITIN U ORGANIZMU

#### 1.3.1. Struktura i uloga feritina

Najviše istražen oblik feritina je feritin izoliran iz slezene konja, koji se ujedno smatra i modelom ljudskog feritina (Bou-Abdallah, 2010; Carmona i sur., 2013). Ljudski feritin sastoji se od 24 podjedinice izgrađene od dva evolucijski konzervirana proteinska lanca od kojih svaki sadrži po 4 alfa uzvojnice, a zajednički formiraju šuplju sferičnu proteinsku ljusku, odnosno nanokavez (slika 8.). Feritinski nanokavez sadrži dvije vrste pora, hidrofilne kroz koje željezo ulazi u unutrašnjost proteinske ljuske i hidrofobne za koje se smatra da nemaju ulogu u prometu željeza već da služe za prolazak kisika i vodikovog peroksida (Finazzi i Arosio, 2014; Bou-Abdallah, 2010; Arosio i sur., 2009). Pohrana željeza vrlo je učinkovita. Smatra se da feritin može pohraniti oko 4500 iona željeza, iako je u prosječnoj molekuli feritina pohranjeno tek pola od te količine (Linder, 2013). Sposobnost istovremene detoksikacije i pohrane metala u feritinu, osigurava zaštitu stanice od željezom posredovanih toksičnih reakcija, a učinkovito oslobađanje željeza omogućuje njegovu bioraspoloživost u esencijalnim reakcijama (Arosio i Levi, 2009; Finazzi i Arosio, 2014).

Eukarioti eksprimiraju dva glavna feritinska gena koji kodiraju za dvije podjedinice feritina, bliske u pogledu primarne i tercijarne proteinske strukture, ali s različitim ulogama. Teška podjedinica (feritin teški lanac, *engl.* feritin heavy chain FtH), molekulske mase od 21 kDa, važna je zbog svoje feroksidazne aktivnosti, a laka podjedinica (feritin laki lanac, *engl.* feritin light chain, FtL), molekulske mase 19 kDa služi za skladištenje željeza (Carmona i sur., 2013). Podjedinice feritina udružuju se u različitim, tkivno specifičnim omjerima, što rezultira formiranjem velikog broja različitih izoferitina. Feritini bogati FtH nađeni su u srcu i mozgu sisavaca, gdje je njihova feroksidazna aktivnost važan antioksidativni mehanizam, a feritini s većim omjerom FtL nađeni u jetri i slezeni imaju važnu ulogu u skladištenju (Arosio i sur., 2009).



**Slika 8.** Struktura feritina

Ljudski feritin sastoji se od 24 podjedinice. Svaka podjedinica sadrži četiri uzvojnice (A), a 24 takve podjedinice formiraju šuplje proteinsko klupko (B). U centar ove sferične proteinske strukture smješta se i do 4 500 atoma željeza (Arosio i sur., 2009).

Točan proces ulaska i mineralizacije željeza unutar nanokaveza feritina još uvijek je predmet rasprave. Do sada najbolje prihvaćen mehanizam je proces u kojem se Fe (II) veže za postranični karboksilni lanac proteina koji okružuje hidrofilnu poru feritinske molekule, nakon čega se pomiče u vezno mjesto na FtH koje nazivamo feroksidazni centar. U feroksidaznom centru, dva atoma željeza oksidiraju se uz djelovanje kisika te dolazi do formiranja vodikovog peroksida. Budući da se vodikov peroksid odmah iskorištava u reakcijama oksidacije željeza na susjednim feroksidaznim centrima, ne dolazi do oslobađanja ROS. Oksidirano Fe(III) zatim se transportira u unutrašnjost feritina gdje se mineralizira i formira mineralnu ferihidritnu jezgru feritina (Finazzi i Arosio, 2014). Prisutnost male količine FtL u svakoj molekuli feritina olakšava transport željeza s feroksidaznog centra u unutrašnjost proteina i time doprinosi skladišnoj funkciji (Arosio i sur., 2009). Iako se dugo smatralo kako se željezo u feritinu pohranjuje u obliku minerala ferihidrita ( $5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ ), nedavne studije pokazale su kako se moguće radi o polifazičnom mineralu koji uključuje ferihidrit, magnetit i hematit. Mineralna srž, promjera 7-8



nm, sadrži i fosfatne ione koji se vežu za feroksidazni centar ili u njegovoj blizini, a povećavaju brzinu vezanja željeza i olakšavaju migraciju željeza kroz protein (Watt i sur., 2010).

Feritine kod sisavaca nalazimo uglavnom u citoplazmi stanica gdje se i sintetiziraju na citosolnim ribosomima, u lizosomima gdje se razgrađuju te manju količinu izlučenu u izvanstanične tekućine (Linder, 2013). Mala količina feritina izlučuje se u cirkulaciju i korelira s unutarstaničnim koncentracijama željeza, što čini feritin važnim pokazateljem sadržaja željeza u organizmu. Serumski je feritin građen isključivo od FtL, siromašan je željezom te čini relativno malu frakciju ukupnog feritina u organizmu. Koncentracija serumskog feritina povećava se tijekom upala i infekcija te u odgovoru na oksidativni stres (Arosio i sur., 2009). Poseban oblik feritina, mitohondrijski feritin, građen je kao homopolimer od 24 FtM podjedinice koje su homologne FtH, a on služi za sekvstriranje željeza kako bi se osigurala adekvatna biosinteza hema i drugih proteina koji sadrže željezo (Linder, 2013). Mitohondrijski feritin ograničen je na stanice s visokom metaboličkom aktivnošću, posebno testise, srce i mozak (Arosio i sur., 2017).

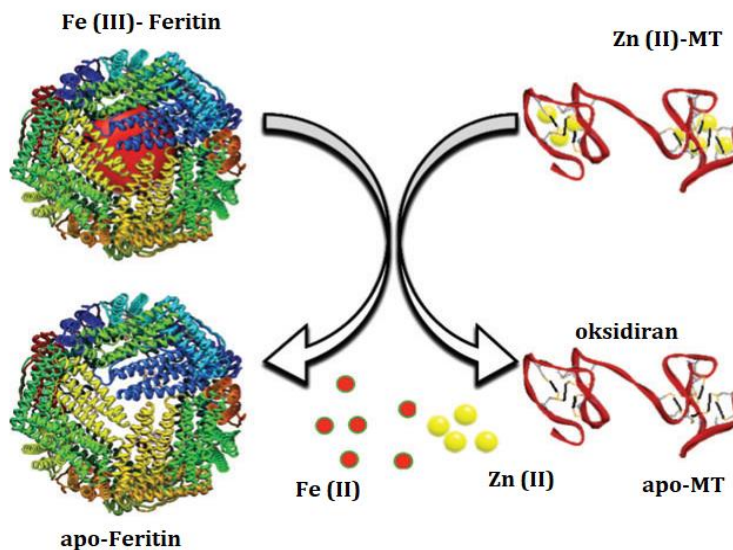
Sadržaj feritina u citoplazmi reguliran je na razini translacije mRNA za tešku i laku podjedinicu feritina u odgovoru na unutarstaničnu koncentraciju slobodnog željeza. Geni za feritin eksprimirani su u svim stanicama, a mehanizam regulacije putem IRE/IRP opisan je u poglavlju 1.2.. Regulacija na razini transkripcije zaslužna je za određivanje tkivno specifičnog omjera podjedinica feritina, koji je važan za dinamičku ravnotežu citosolne pohrane željeza i njegove dostupnosti. Oksidativni stres može inducirati transkripciju teške podjedinice feritina aktivacijom transkripcijskog faktora Nrf2 (*engl.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2) koji se veže za ARE (*engl.* antioxidative response element) slijed na promotorskoj regiji feritinske mRNA (Arosio i sur., 2017). Sintezu feritina na razini transkripcije mogu regulirati i proupalni citokini poput TNF- $\alpha$  (*engl.* tumor necrosis factor  $\alpha$ ) koji djeluju indukcijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (*engl.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), koji zatim potiče transkripciju. Osim na razini transkripcije, citokini mogu djelovati i na razini translacije aktivacijom iNOS (*engl.* inducible nitric oxide synthase) koja povećava sintezu NO, a on posljedično aktivira IRP1 i IRP2 (Torti i Torti, 2002). Međutim čini se da je snažna translacijska regulacija feritina ipak važnija je od transkripcijske, u cilju osiguravanja brze prilagodbe na promjene koncentracije željeza u stanici (Finazzi i Arosio, 2014).

U fiziološkim uvjetima željezo se iz feritina otpušta prilikom smanjenja koncentracije slobodnog željeza u citosolu. Glavni mehanizmi oslobađanja željeza uključuju razgradnju feritinske proteinske ljuske putem dva mehanizma, lizosomalne razgradnje i razgradnje u proteasomu. Dominantni mehanizam je proces lizosomalne razgradnje u kojem dolazi do razgradnje i drugih proteina koji sadrže željezo, poput hemoglobina, nakon čega se željezo otpušta u citoplazmu putem DMT1 i postaje dio LIP-a (Linder, 2013; Zhang i sur., 2010). Razgradnja feritina u lizosomima zahtijeva receptor NCOA4 (*engl.* nuclear receptor coactivator 4), koji osigurava selektivnu dostavu feritinskog kompleksa u autofagosom, nakon čega slijedi proces razgradnje feritinske proteinske ljuske koji nazivamo feritinofagija. Feritinofagija je važan stanični mehanizam regulacije biorasploživosti željeza, a ovakav kontrolirani oblik intralizosomalne razgradnje feritina štiti ostale stanične organele od potencijalnih oštećenja uzrokovanih otpuštanjem slobodnog željeza (Mancias i sur., 2014). Proteasom uobičajeno razgrađuje oksidirane, oštećene, mutirane ili pogrešno smotane molekule, koji su prethodno obilježene ubikvitinom. U proteasomu se uglavnom razgrađuju molekule feritina siromašne željezom i prazan feritin (apoferitin), za razliku od lizosoma, u kojima se uglavnom razgrađuju feritini bogati željezom (Linder, 2013). Lizosomalna razgradnja ključni je proces u mobilizaciji željeza iz feritina, a odvija se ovisno o staničnim uvjetima i tipu stanice (Finazzi i Arosio, 2014). Ukoliko dođe do nakupljanja velike količine željezom bogatog feritina u stanici, dolazi do stvaranja feritinskih agregata. Agregati feritina razgrađuju se u lizosomu, na željezom bogatu srž feritina i ostatke peptida koje nazivamo hemosiderin. Osim iz feritina, u slučaju potrebe u organizmu, željezo se učinkovito mobilizira i iz hemosiderina (Anderson i Frazer, 2017).

### **1.3.2. Interakcija feritina s drugim metalima, proteinima i uloga u oksidativnom stresu i starenju**

Iako je najznačajnija funkcija feritina direktno vezana uz pohranu željeza, feritin ima sposobnost vezanja i drugih metala. Zbog negativnog naboja aminokiselinskih ogranaka koji okružuju hidrofilne pore, feritin ima preferenciju prema dvovalentnim kationima, ali može smjestiti i neke jednovalentne ili trovalentne metale (He i Marles-Wright, 2015; Joshi i

Zimmerman, 1988). Drugi najčešći prijelazni metal u organizmu je cink, a slijedi ga bakar. Cink se veže na specifična mjesta na feritinu i djeluje inhibitorno na vezanje željeza, dok bakar ima pozitivan katalitički učinak na vezanje željeza za feritin. Slobodan bakar također je Fenton reaktivan metal, koji se mora održavati u niskim koncentracijama, a u cirkulaciji se uglavnom prenosi vezan za ceruloplazmin. Osim cinka i bakra, najznačajnije je visokoafinitetno vezanje toksičnog metala, kadmija za feritin koje djeluje inhibitorno na vezanje željeza, što može imati za posljedicu otpuštanje slobodnog željeza i nastajanje oksidativnog stresa. U održavanju homeostatskih koncentracija cinka, bakra, ali i željeza, sudjeluju u najvećoj mjeri metaloproteini ceruloplazmin i metalotionein, koji također mogu ulaziti u interakciju s feritinom (slika 9.) (Carmona i sur., 2013; Atrian i Capdevila, 2013). Metalotioneini (MT) su mali proteini s velikom količinom tiolnih skupina koje mogu vezati različite metale, a s najvećim afinitetom vežu Zn i Cd te zajedno s feritinom sudjeluju u zaštiti stanica od oksidativnog stresa uzrokovanog pojavom slobodnih metala u citosolu (Baird i sur., 2006). Osim metaloproteina koji štite stanicu od ROS, u stanici je prisutno i nekoliko antioksidativnih enzima, koji vrlo brzo metaboliziraju nastale toksične produkte. Glutation peroksidaza (*engl.* glutathione peroxidase, GPx) reducira lipidne perokside uz pomoć GSH, nakon čega se on reciklira uz djelovanje glutation reduktaze i NADPH. Superoksid dismutaza (SOD) katalizira metabolizam superoksidnog radikala u vodikov peroksid, a katalaza (*engl.* catalase, CAT) pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik (Nakamura i sur., 2019).



**Slika 9.** Shematski prikaz posljedica interakcije feritina bogatog željezom i MT bogatog cinkom (Atrian i Capdevila, 2013)

Starenjem organizma smanjuje se njegova sposobnost prevencije toksičnih procesa zbog promjene ravnoteže između stvaranja oksidativne štete i antioksidativnih mehanizama. Reaktivni kisikovi spojevi oštećuju DNA, sudjeluju u peroksidaciji lipida i proteina te mogu inducirati smrt stanice. Nedavno je otkriven novi oblik stanične smrti, ferroptaza, koji se razlikuje od svih dosad poznatih, a ovisan je o željezu. Ferroptaza je potaknuta inhibicijom funkcije glutationa, molekule koja sudjeluje u antioksidativnoj obrani stanice. Proces ferroptoze za stanicu je letalan, a karakterizira ga o željezu ovisna akumulacija lipidne peroksidacije i oštećenje membrana (Cao i Dixon, 2016). Lizosomi ne razgrađuju samo citosolne biomolekule, već i čitave organele, uključujući mitohondrije, endoplazmatski retikulum, ribosome i peroksisome procesom makroautofagije. Ova uloga čini lizosom najvažnijim staničnim organelom u zaštiti stanice od utjecaja toksičnih produkata razgradnje. Međutim kiseli reduktivni medij lizosoma s oslobođenim Fe (II) i dostupnim vodikovim peroksidom, moguć su izvor i pojačanog nastanka ROS, pogotovo kada se metabolizam lizosoma uspori i/ili kad nedostaju prethodno navedeni zaštitni spojevi i enzimi (Baird i sur., 2006). Biomolekule i organeli koji se razgrađuju u lizosomu, djelomično su, ili u potpunosti, oštećeni i interferiraju s normalnim staničnim funkcijama, stoga ih nazivamo „biološki otpad“ stanice. Biološki otpad uključuje i lipofuscin, nerazgradivi stanični materijal, primarno sastavljen od modificiranih proteina i ostataka razgradnje lipida, ali može sadržavati ugljikohidrate i metale, uključujući željezo, bakar, aluminij, cink, kalcij i mangan. Brzina nakupljanja lipofuscina u obrnutoj je korelaciji s duljinom životnog vijeka, što ukazuje na činjenicu da je akumulacija lipofuscina štetna za stanicu. Budući da je lipofuscin bogat željezom, povećan oksidativni stres u stanici može rezultirati oštećenjem lizosomalne membrane te izlaskom lizosomskog sadržaja u citoplazmu što može posljedično završiti u apoptozi (Kurz i sur., 2007).

#### 1.4. RAZLIKE U SADRŽAJU ŽELJEZA S OBZIROM NA DOB I SPOL

Kliničke i epidemiološke studije pokazale su kako gubitak homeostaze željeza u organizmu ima značajnu ulogu u patofiziologiji brojnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes, karcinom i neurodegenerativne bolesti. Starije osobe posebno su sklone anemiji što ima negativne učinke na mišićnu snagu, fizički performans, kogniciju i životni vijek (Xu i sur., 2012). Jedan od glavnih pokazatelja procesa biološkog starenja je akumulacija željeza u tkivima te povećanje lipidne peroksidacije u organizmu, koji inverzno koreliraju sa životnim vijekom nekih vrsta. Tkivno specifično nakupljanje željeza ukazuje na činjenicu da starenjem dolazi do promjene tkivne homeostaze željeza. Promatranjem lipidne peroksidacije u procesu starenja, uočeno je povećanje oksidativnog stresa u jetri, bubregu i mozgu, a željezo se pokazalo kao glavni katalizator ovih reakcija (Cook i Yu, 1998).

Cook i Yu pokazali su da je akumulacija željeza s dobi manja kod životinja na restriktivnoj prehrani u odnosu na skupinu životinja koja je imala slobodan pristup hrani i vodi. Također su potvrdili da postoji značajna akumulacija željeza s dobi, kao i značajna razina lipidne peroksidacije. Mehanizam kojim restriktivna prehrana suprimira oksidativni stres uključuje brži proces čišćenja staničnog otpada autofagocitozno-lizosomalnim putem te povećanu ekspresiju enzima koji razgrađuju slobodne radikale, poput SOD, GPx i CAT kao i povećanu koncentraciju staničnih antioksidansa poput askorbinske kiseline i glutationa (Cook i Yu, 1998).

Neka od prvih istraživanja spolnih razlika u koncentraciji željeza utvrdila su da anemične ženke štakora bolje iskorištavaju željezo iz prehrane od anemičnih mužjaka u istim uvjetima (Smith i Otis, 1937). Widdowson i McChance 1953.g., pokazali kako ženke štakora tijekom života akumuliraju veće količine željeza u organizmu od mužjaka te kako je sadržaj u jetri, slezeni i bubregu ženki za dva do tri puta prelazio razinu sadržaja kod mužjaka (Widdowson i McChance, 1953). Navedene rezultate potvrđuju novija istraživanja ukupne količine metala u pojedinim organima koje pokazuju i spolne razlike u nakupljanju željeza. Pri tome je željeza oko dva puta više u u bubregu odraslih ženki naspram mužjaka (tablica 1.) (Ljubojević i sur., 2019; Orct i sur., 2017).

**Tablica 1.** Koncentracije željeza u tkivu jetre i bubrega lažno gonadektomiranih i gonadektomiranih mužjaka i ženki štakora (Ljubojević i sur., 2019).

Parametar	Mužjaci		Ženke	
	kontrolna skupina	kastracija	kontrolna skupina	ovarijektomija
željezo (Fe)				
jetra (mg/kg tkiva)	157 ± 9	243 ± 13 *	427 ± 37 *	300 ± 15 **
bubreg (mg/kg tkiva)	47 ± 5.1	50 ± 2.3	87 ± 6.4 *	66 ± 4.2 **

S obzirom da je kod ženki utvrđena viša razina ekspresije hepcidina, smatra se kako je uzrok akumulacije željeza u tkivima ženki povećana razgradnja FPN1 djelovanjem hepcidina, zbog čega je inhibirano otpuštanje željeza iz makrofaga i željezom bogatih stanica jetre. Ženski spolni hormoni, poput estrogena, mogu stimulirati ekspresiju hepcidina, a muški spolni hormon testosteron, inhibira transkripciju hepcidina, što rezultira smanjenom razgradnjom FPN1 te pojačanim oslobađanjem željeza iz tkiva mužjaka u odnosu na ženke. Testosteron stimulira eritropoezu, što rezultira povećanim brojem eritrocita i većom koncentracijom Hb kod mužjaka. Kod ljudi, prije menopauze, žene obično imaju niže razine serumskog feritina i niže zasićenje transferina nego muškarci, moguće zbog fiziološkog gubitka krvi menstruacijom. Tijekom menopauze, razine serumskog feritina kod žena se povećavaju 2-3 puta u odnosu na razine prije menopauze. Fiziološki gubitak krvi tijekom reproduktivne dobi žena ima supresivni učinak na transkripciju hepcidina, što je ekvivalentno učinku testosterona kod muškaraca (Kong i sur., 2014). Budući da ženke štakora nemaju menstrualno krvarenje, u organizmu štakora nakon spolnog sazrijevanja dolazi do akumulacije željeza koja se nastavlja do kraja života, dok je multiparni graviditet jedini potencijalni faktor kojim se pohranjeno željezo mobilizira (Widdowson i McChance, 1948)

### 1.5. RAZLIKE U SADRŽAJU FERITINA S OBZIROM NA DOB I SPOL

Brzina sinteze feritina u jetri ovisi o dostupnosti željeza, a u bubrezima o reapsorpciji istog iz glomerularnog filtrata. Dosadašnja istraživanja su pokazala da postoji značajna razlika između mužjaka i ženki u skladištenju željeza u obliku feritina u jetri, a nešto manja i u bubregu. Koncentracija feritina u jetri ženke štakora oko četiri puta veća nego kod mužjaka iste dobi.

Prilikom parenteralne primjene željeza, velike se količine odlažu u jetri te se ove spolne razlike minimaliziraju, dok se u bubregu odlaže količina željeza koja je prošla cirkulacijom krvi kroz organizam pa su te razlike i dalje prisutne. Ovakav zaključak ukazuje da akumulacija željeza u organizmu ovisi o načinu unosa i razlikama u pohrani. Ovaj efekt nije posljedica smanjenog kapaciteta sinteze feritina kod mužjaka, budući da primjena visokih doza željeza u oba spola tek neznatno smanjuje ove razlike. Ispitivanjem brzine razgradnje feritina s obzirom na spol, utvrđeno je da je brzina razgradnje veća kod ženki, što isključuje mogućnost da je razlika u koncentraciji posljedica sporije razgradnje feritina kod ženki. Iako je ukupna koncentracija feritina u bubregu niža u odnosu na jetru, slične su razlike u korist ženki primijećene i u tkivu bubrega (Linder i sur., 1973).

Promjena sadržaja feritina s dobi nedovoljno je istražena. Ispitivanja na Wistar štakorima u dobi od pet i pol tjedana pa sve do sedmog tjedna starosti pokazala su kako životinje imaju približno konstantne i relativno niske razine feritina kod svih jedinki, neovisno o dobi i spolu. U sedmom tjednu dolazi do spolnog sazrijevanja i tada dolazi do povećanja sinteze feritina i akumulacije feritinskog željeza u oba spola, ali dvostruko većom brzinom kod ženki u odnosu na mužjake (Linder i sur., 1973; Bjørklid i Helgeland, 1970). Razlike u ekspresiji pojedinih podjedinica feritina s obzirom na spol i dob kao i njihove uzroke potrebno je dodatno ispitati.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Željezo i njegova uloga u oksidativnom stresu i lipidnoj peroksidaciji desetljećima se istražuje u teoriji starenja. Analiza povezanosti stvaranja slobodnih kisikovih radikala i lipidne peroksidacije sa sadržajem željeza u organizmu provodi se na različitim vrstama životinja, prije svega glodavcima. Pokazalo se kako promjena homeostaze željeza u organizmu uzrokuje nakupljanje željeza tijekom života u tkivima, što uzrokuje stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji oštećuju biološke molekule. Upravo je ovaj mehanizam oštećenja stanica i tkiva u pozadini patofiziologije brojnih bolesti uključujući bolesti srca, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, bolesti jetre i karcinoma (Hahn i sur., 2009).

Neka od prvih istraživanja na glodavcima pokazala su značajnu akumulaciju željeza tijekom života u tkivima ovisno o spolu (Massie i sur., 1983; Widdowson i McChance, 1953; 1948). Utvrđeno je kako su dob i spol važni faktori koji utječu na koncentraciju željeza u organizmu, ali i ukupnu koncentraciju feritinskog proteina koji ga većinom sigurno skladišti. Budući da se ove razlike ne primjećuju kod tek rođenih životinja, već postaju značajnije tek nakon spolnog sazrijevanja, pretpostavlja se kako je za veću akumulaciju željeza kod ženki odgovoran ženski spolni hormon, estrogen (Linder i sur., 1973; Bjørklid i Helgeland, 1970). Ovom zaključku doprinosi i činjenica da kastracija mužjaka povećava nakupljanje željeza, dok analogno tome ovarijektomija ženki smanjuje nakupljanje željeza u jetri eksperimentalnih životinja (Ljubojević i sur., 2019). Ženski organizam akumulacijom željeza u organima osigurava dovoljne količine željeza za potomstvo (Widdowson i McChance, 1948). Budući da se približno jednaka ukupna količina željeza prenosi na potomke neovisno o veličini legla, smatra se kako jedinke iz većeg legla nasljeđuju manje željeza (Linder i sur., 1973). Razlike u sadržaju feritina s obzirom na dob i spol nisu dovoljno ispitane. Smatra se kako se veća količina feritina tijekom života nakuplja u tkivima ženki nego u tkivima mužjaka. Točan uzrok spolnih razlika u koncentraciji željeza i feritina u različitim tkivima još je uvijek predmet istraživanja, ali čini se kako značajnu ulogu u ovim razlikama imaju spolni hormoni, testosteron i estrogen. Akumulacija željeza i s njim povezana oštećenja tkiva u pozadini su patofiziologije brojnih bolesti. Feritin svojom glavnom ulogom pohrane štiti tkiva i stanice od željezom posredovanih oštećenja, zbog čega je važno utvrditi u kojoj mjeri je njegova ekspresija u pojedinim tkivima ovisna o spolnim hormonima te kako se ona mijenja s dobi.

Cilj ovog istraživanja je primjenom imunokemijskih metoda nove generacije pratiti raspodjelu i sadržaj obje podjedinice feritina u bubregu te utvrditi u kojoj mjeri se razlikuju kod ženki i mužjaka, ali i s obzirom na dob. Bubrezi su po pohrani željeza organ odmah iza jetre. Naime, nakupljanje željeza u njima odvija se najvjerojatnije kroz glomerularnu filtraciju i reapsorpciju organizmu potrebnih tvari. Time bubrezi ženki snose i veći teret opterećenja oksidativnim stresom, no postoji i veći stupanj zaštite od istog povišenom ekspresijom feritina i metalotioneina. Zbog visoke evolucijske konzerviranosti aminokiselinskog slijeda teškog i lakog lanca feritina, pretpostavka je da će protutijela razvijena protiv podjedinica humanog feritina jednako učinkovito vezati i feritinske podjedinice glodavaca. Smatra se kako su uočene spolne razlike u ekspresiji feritina u bubregu posljedica stimulacijskog učinka estrogena, odnosno inhibicijskog učinka testosterona ili kombinacija oba navedena učinka. Povećanje sadržaja feritina u organima s dobi smatra se jednim od adaptacijskih mehanizama pri nakupljanju željeza kojim se ostvaruje prevencija nastanka slobodnih radikala u tkivima. Ovo istraživanje obuhvaća utvrđivanje mogućih spolnih razlika u sadržaju i raspodjeli obje podjedinice feritina u bubregu mužjaka i ženki u dobi od 3 mjeseca starosti te 2 godine.

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

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) AGEMETAR, IP-11-2013-1481. U svim pokusima korišteni su štakori soja Wistar uzgojeni u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

### 3.1. OTOPINE I PUFERI

Fosfatni pufer (PBS): 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4.

Pufer za izolaciju staničnih homogenata (homo-pufer):

300 mM manitol, 5 mM etilen-glikol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N'-tetraoctena kiselina (EGTA), 12 mM Tris/HCl, pH 7.4.

Pufer za denaturaciju proteina (Laemmli-pufer):

0.5 M Tris/HCl pH 6.8 (22 % v/v), 30% natrij-dodecil sulfat (sodium-dodecyl sulfate, SDS) (12 % v/v), 80% glicerol (54 % v/v), zasićena otopina plavila bromfenola (brom-phenol-blue, BPB) (12 % v/v). Puferu se neposredno prije uporabe dodaje  $\beta$ ME u omjeru 17:3.

Otopine i puferi za SDS – poliakrilamidnu gel elektroforezu (SDS–PAGE):

a) akrilamid/ bis-akrilamid : 30 g poliakrilamida/ 0.8 g bis-akrilamida u 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Skladišti se na 4o C do upotrebe.

b) pufer A : 1.5 M Tris-HCl, pH 8.9 (18.17 g/ 100 ml) – pufer za pripravljanje gela za odjeljivanje (engl. separating gel).

c) pufer B : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (6.06 g/ 100 ml) – pufer za pripravljanje gela za sabijanje (engl. stacking gel).

d) amonijev persulfat (APS): 100 mg/ 7.1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  – napravljen svjež.

e) 10 % (m/v) SDS u  $\text{H}_2\text{O}$ .

Pufer za poliakrilamidnu gel elektroforezu (PAGE–pufer):

25 mM Tris baza, 0.2 M glicin, 1 % SDS.

Pufer za prijenos proteina na membranu (transfer–pufer):

15.6 mM Tris, 120 mM glicin, 20 % metanol.

Plavilo za bojanje proteina:

otopina Coomassie blue: 0.2 % Coomassie blue (Coomassie blue G-250) u otopini za odbojavanje.

Otopina za odbojavanje: metanol : octena kiselina : re H<sub>2</sub>O u omjeru 5: 1: 4

Pufer za blokiranje (blotto-pufer):

5 % nemasno mlijeko u prahu, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 20 mM Tris/HCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4.

Citratni pufer pH 6:

10mM natrijev citrat otopljen H<sub>2</sub>O (2.94 g/L) i limunska kiselina (acidum citricum) (2.1 g/L) (pH 6).

### 3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR

Proizvodi BSA (albumin iz seruma goveda), PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluorid), benzamidin, antipain (N-(N-a-karbonil-Arg-Val-Arg-Al)-Phe), manitol, Triton-X-100, EGTA (5 etilen-glikol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N'-tetraoctena kiselina), komplet BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat) i NBT (nitromodri tetrazolium klorid) i TEMED (N, N, N',N'-tetrametiletilendiamin) nabavljeni su od tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD). Od tvrtke Serva (Heidelberg, Njemačka) korišteni su proizvodi Coomassie Brilliant Blue G-250 i SDS (Na-dodecil-sulfat). Tris, akrilamid i bisakrilamid nabavljeni su od tvrtke Boehringer (Mannheim, Njemačka). Ostatak kemikalija nabavljen je od različitih tvrtki, koje su u nastavku navedene abecednim redom. Od tvrtke BioRad (Hercules, CA, SAD) nabavljeni su  $\beta$ -merkaptioetanol ( $\beta$ ME), aparatura Mini Protean III Cell te MiniTrans-Blot Cell za SDS-PAGE. Spektrofotometar (CECIL 9000) nabavljen je od tvrtke Cambridge (Engleska, UK). Anestetici Narketan i Xylapan nabavljeni su od tvrtke Chassot (Bern, Švicarska). Pumpa za perfuziju (Masterflex pumpa) nabavljena je od tvrtke Cole-Parmer (Chicago, IL, SAD). Od tvrtke Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, SAD) nabavljena je digitalna kamera (SPORT RT), paraformaldehid od tvrtke EMS (Los Almitos, CA, SAD), uzorak standarda molekulskih masa proteina od tvrtke Fermentas (Los Almitos, CA, SAD). Od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska) nabavljeni su natrijev citrat, limunska kiselina, izopropanol i etanol. Kriomikrotom (Leica CM 1580) nabavljen je od tvrtke Leica Instruments (Nussloch, Njemačka), glicerol od tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka), a hidrofobna najlonska membrana i Immobilon (Polyvinylidene fluoride, PVDF) od tvrtke Millipore (Bedford, MA, SAD). Fluorescencijski mikroskop (OPTON III RS) nabavljen je od tvrtke Opton Feintechnik (Oberkochen, Njemačka). Od tvrtke Tissue-Tek, Sakura Finetek (Torrance, CA, SAD) nabavljen je uklopni medij (O.C.T. Compound 4583), a od tvrtke Sorvall

Instruments (Newtown, CT, SAD) nabavljeni su  $\text{NaN}_3$  (natrijev azid), amonijev persulfat (APS), električni homogenizator (Powergen 125), centrifuga s hlađenjem (Sorvall RC2B, rotor SS-34) i predmetna stakalca (Superfrost/Plus Microscope slides). Od tvrtke Vector Labs (Burlingame, CA, SAD) nabavljena je otopina za očuvanje fluorescencije (Vectashield).

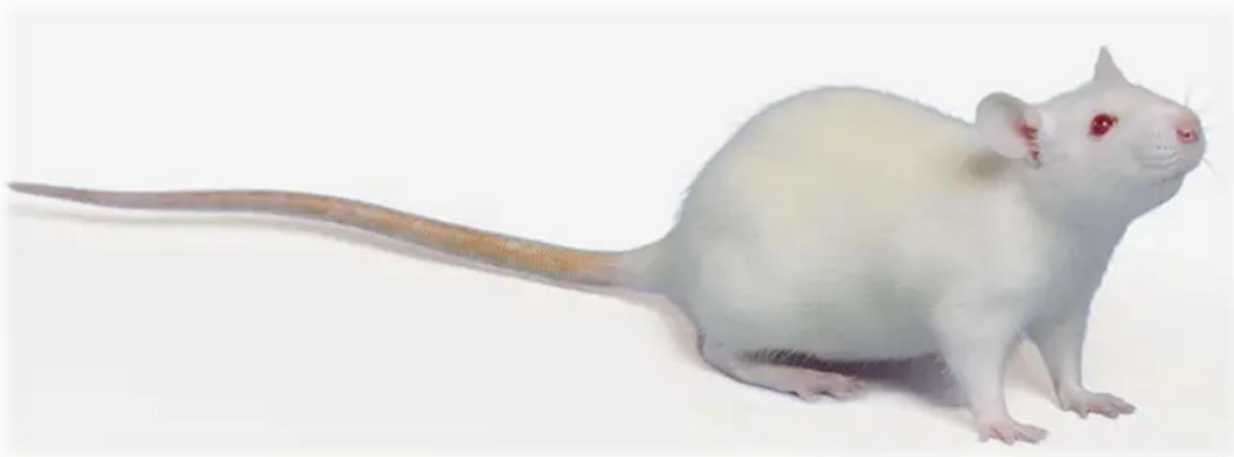
### 3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE

#### a) ispitivanje spolnih i starosnih razlika:

U istraživanjima su korištene muške i ženske jedinke štakora soja Wistar u dobi od 3 mjeseca (odrasle jedinke) i dvije godine uzgojeni u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu (slika 10.). Eksperimentalne životinje uzgojene su u kontroliranim uvjetima, na stalnoj temperaturi od 24 °C s periodičnom izmjenom svjetla i tame. Tijekom pokusa životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi.

#### b) pokusi gonadektomije:

U svrhu ispitivanja utjecaja spolnih hormona na ekspresiju feritina, mužjaci su kastrirani kroz skrotum, a ženke ovarijektomirane dorzalnim (lumbalnim) putem. Isti operativni zahvat prošle su i lažno gonadektomirane životinje uz izuzetak odstranjivanja gonada. Zahvat je proveden uz primjenu anestezije (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p.), a životinje su žrtvovane osam dana nakon operacije.



**Slika 10.** Soj štakora Wistar korišten kao eksperimentalni model tijekom istraživanja. (www.janvier-labs.com)

### 3.4. PROTUTIJELA

#### 3.4.1. Primarna protutijela

Korištena su komercijalno dostupna monoklonska protutijela na teški lanac feritina (*engl.* ferritin heavy chain, FtH (B-12): sc-376594) i laki lanac feritina (*engl.* ferritin light chain, FtL (D-1): sc-390558) nabavljena od tvrtke Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. Svako protutijelo prepoznaje visoko konzervirani aminokiselinski slijed koji je specifičan za pojedini lanac feritina. Ova su protutijela rađena na ljudski oblik feritina, ali zbog visoke očuvanosti aminokiselinskih sekvenca homologija sa štakorskim slijedom je visoka te se može primijeniti za detekciju (slika 11.).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
>NP_002023.2 ferritin heavy chain [Homo sapiens] -teški lanac feritina - humana sekvenca
>NP_036980.1 ferritin heavy chain [Rattus norvegicus]-teški lanac feritina - štakorska sekvenca

NP_002023.2      MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYVYFDRDDVALKNFAKYFLHQSD 60
NP_036980.1      MTTASPSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSCYFDRDDVALKNFAKYFLHQSD 60
                *****

NP_002023.2      HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNSLLELHK 120
NP_036980.1      HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDRDDWESGLNAMECALHLEKSVNSLLELHK 120
                *****

NP_002023.2      LATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDS 180
NP_036980.1      LATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKSIEKELGDHVTNLRKMGAPESGMAEYLFDKHTLGH 180
                *****

NP_002023.2      NES 183
NP_036980.1      ES- 182
                :.

>NP_000137.2 ferritin light chain [Homo sapiens]- laki lanac feritina - humana sekvenca
>NP_071945.3 ferritin light chain 1 [Rattus norvegicus]-laki lanac feritina - štakorska sekvenca

NP_000137.2      MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTSLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKR 60
NP_071945.3      MTSQIRQNYSTEVEAAVNRVLNHLRASVYTSLSLGFFDRDDVALEGVGHFFRELAEEKR 60
                *:*****:***** ***:*:*****:*****:*****

NP_000137.2      EGYERLLKMQNRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNQALLDLHALGSA 120
NP_071945.3      EGAERLLKQNERGGRALFQDVQKPSQDEWGKTEAMEAALALEKNLNQALLDLHALGSA 120
                ** *****:*****:*****:***** ***:*****:*****

NP_000137.2      RTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPE-----AGLGEYLFERLTL 172
NP_071945.3      RTDPHLCDFLESHFLDKEVKLIKKMGNHLTNLRRVAGPQPAQTGVAQASLGEYLFERLTL 180
                *****:*****:*****:*****:*****:*****

NP_000137.2      KHD 175
NP_071945.3      KHD 183
                ***

```

**Slika 11.** Prikaz usporedbe humanih i štakorskih sekvenci za teški i laki lanac feritina ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Zvezdicama su označeni identični aminokiselinski ostatci, a linijom iznad sekvenci označeni su slijedovi aminokiselina korišteni za razvoj specifičnih protutijela protiv FtH i FtL.

Aminokiselinski sljedovi korišteni za razvoj protutijela na oba lanca feritina visoko su homologni kod ljudi i kod štakora te ukazuju na mogućnost korištenja protutijela razvijenih na humane lance feritina u istraživanjima na štakorskom feritinu. Korištena protutijela obilježavaju proteinske pruge na ~ 20 kDa (FtL, protutijelo D-1, u razrijeđenju 1:1000) i ~ 21 kDa (FtH, protutijelo B-12 u razrijeđenju 1:500) u western analizi, a u imunohistokemijskim tehnikama korišteni su za intracelularno bojanje bubrežnih kanalića.

### **3.4.2. Sekundarna protutijela**

Sekundarno protutijelo za oba primarna monoklonska protutijela (D-1 i B-12) korišteno u western analizi je kozje protutijelo protiv mišjeg IgG-a (*engl.* goat anti-mouse AP, GAM-AP) koncentracije 0,25 µg/ml koje je obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom u razrijeđenju 1:1000.

Sekundarno protutijelo na oba primarna monoklonska protutijela korišteno u imunohistokemiji bilo je magareće protutijelo usmjereno protiv mišjeg IgG-a (*engl.* donkey anti-mouse CY3, DAM-CY3) obilježeno fluorescirajućom CY3 (*engl.* CYanine dye) molekulom koja daje crveno fluorescentno obojenje (ekscitacijski/emisijski maksimum 555/567 nm) u razrijeđenju 1:400.

Oba sekundarna protutijela komercijalno su nabavljena i korištena prema uputama proizvođača. Proizvod su tvrtke Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD.



## 3.5. METODE ISTRAŽIVANJA

### 3.5.1. Izolacija homogenata bubrega

Homogenati bubrega pripremljeni su metodom diferencijalnog centrifugiranja. Životinje su žrtvovane prekidanjem vratne kralježnice, nakon čega su im izvađeni bubrezi i odmah stavljeni u hladni PBS. Tkivo organa zatim je usitnjeno i odvagano te su pripremljeni 10% homogenati. Uzorci su stavljeni u hladni homo-pufer, dodani su im inhibitori proteaza: 1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina i 0.1 µg/ml antipaina te su homogenizirani električnim homogenizatorom Powergen 125 na način da su prvo homogenizirani na najjačoj brzini 1 min, zatim je napravljena pauza od 2 min i slijedila je ponovna homogenizacija 1 min. Uzorci su centrifugirani u centrifugi Sorvall RC2B s hlađenjem na 6,500 rpm (5,000 g) tijekom 15 min čime su istaložene cijele stanice, jezgre, mitohondriji i nerazgrađeni tkivni matriks. Nadtalog dobiven centrifugiranjem koristio se kao uzorak homogenata. U uzorcima je određena koncentracija proteina. Uzorci su pripremljeni s Laemmli puferom na jednake koncentracije i smrznuti na -20° C do daljnjeg korištenja. U ovim je uzorcima određen sadržaj obje podjedinice feritina metodom western analize. Svi su postupci pripreme provedeni na niskoj temperaturi (ledene površine i ledeni puferi.)

### 3.5.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima izoliranih membrana mjerena je spektrofotometrijski, metodom po Bradfordu (1976.) Metoda se temelji na reakciji vezanja boje, Coomassie Brilliant Blue G-250, na protein. Boja pritom mijenja ionsko stanje i apsorbira svjetlost valne duljine 595 nm. Mjerenjem otopina albumina iz goveđeg seruma (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA) u koncentracijskom rasponu od 0.2 – 1.2 mg/ml dobivena je standardna krivulja koncentracije proteina. Osjetljivost ove metode je 0.1 mg/ml. Uzorci su razrijeđeni na način da im je optička gustoća unutar lineranog područja standardne krivulje očitana nakon 10 min stajanja u otopini boje. Optička gustoća se očitavala naspram slijepe probe (uzorak bez proteina). Mjerenja su izvedena spektrofotometrom CECIL 9000. Koncentracije proteina u uzorcima očitane su iz standardne krivulje.

Masa izmjerenih proteina izračuna se prema formuli:

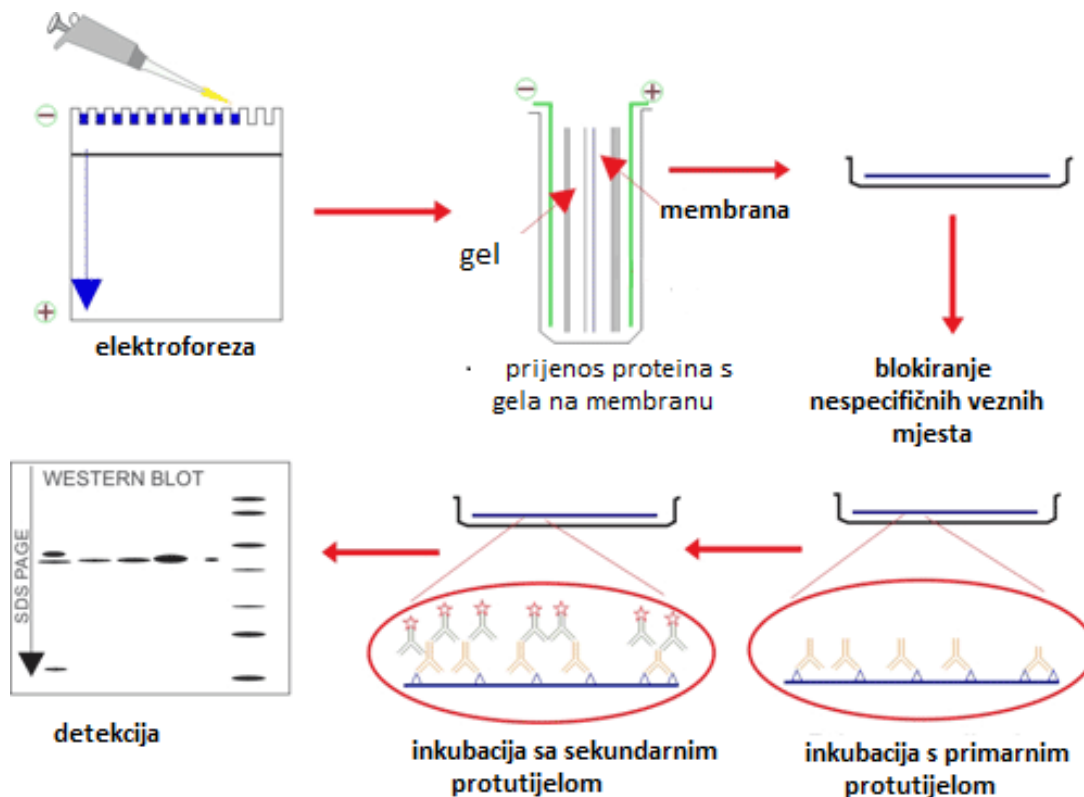
$$\frac{\text{mg (proteina)}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{g (očitanje proteina)} \times \text{razrjeđenje}}{1000}$$

### 3.5.3. SDS–elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i western analiza

Koncentracija proteina u uzorcima homogenata podešena je na 4mg/ml. Uzorci za SDS-PAGE pripremljeni su miješanjem s Laemmli puferom za denaturaciju proteina. Konačna koncentracija proteina u uzorku je bila 3 mg/ml, a uzorak je osim proteina sadržavao 1% SDS, 12% (v/v) glicerol, 30 Mm Tris/HCl (pH 6.8), BPB u tragovima i 5% βME. Ispitivanje uvjeta pripreme proteina za western analizu obavljena je prethodno, zagrijavanjem uzoraka na različitim temperaturama u svrhu utvrđivanja osjetljivosti pojedinih antigena na termičku obradu i promjenu konformacije razaranjem disulfidnih veza kod 37° C tijekom 30 min, 65° tijekom 15 min ili 95°C tijekom 5 min sa i bez denaturirajućeg sredstva β-merkaptetanola (βME), koji razara disulfidne veze u proteinskim strukturama. Optimalni uvjeti za dobivanje proteinskih pruga obiju podjedinica feritina bili su zagrijavanje na 95° C tijekom 5 min uz prisustvo βME.

Metoda SDS-PAGE temelji se na razdvajanju proteina u električnom polju na osnovu mase proteina. Proteini su obloženi negativnim nabojem detergenta SDS, pa je razdvajanje temeljeno isključivo na masi i to na način da je prijeđeni put u poliakrilamidnom gelu obrnuto proporcionalan logaritmu molekulske mase proteina. Proteini ulaze u električno polje kroz sabijajući gel, niže pH vrijednosti i koncentracije u kojem se proteini sabijaju u vrpce, a zatim ulaze u razdvajajući gel (20%-tni) u kojem se razdvajaju na temelju molekulske mase (Laemmli, 1970). Usporedno s proteinima homogenata bubrega, kroz SDS-PAGE provodio se i uzorak standarda molekulskih masa u rasponu 10-200 kDa, prethodno pripremljen na isti način kao i uzorak smjese proteina.

Za provedbu SDS-PAGE korištena je aparatura Mini Protean III Cell uz stalan napon od 110 V u vremenu od 3 sata. Proteinske se molekule zatim s gela elektroforetski prenose na hidrofobnu najlonsku membranu Immobilon (PVDF) pomoću aparature MiniTrans-Blot Cell, uz stalan napon od 100 V tijekom 2 sata. Membrana se tijekom 30 min inkubira u 1%-tnoj otopini glutaraldehina kako bi se proteini malih molekulskih masa zadržali na PVDF membrani nakon elektroforetskog prijenosa proteina. Za provjeru uspješnosti prijenosa razdvojenih proteina iz gela na membranu korišteno je bojanje membrane otopinom boje Coomassie blue te ispiranje u otopini za odbojavanje. Membrane su zatim 1 sat inkubirane u blotto-puferu kako bi se blokiralo nespecifično vezanje protutijela. Obezbojene i blokirane membrane zatim su inkubirane s otopinama primarnih protutijela (razrijeđenim u blotto-puferu) tijekom noći uz miješanje na 4 °C. Razrjeđenje otopine protutijela za FtL bilo je 1:1000, odnosno za FtH 1:500. Membrane su nakon toga više puta ispirane blotto-puferom bez protutijela te inkubirane tijekom 1 sata u otopini sekundarnog protutijela na sobnoj temperaturi (slika 12.).



**Slika 12.** Prikaz postupka SDS elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, prijenos na PVDF membranu, te inkubacija s primarnim i sekundarnim protutijelima do konačne detekcije feritina ([www.cusabio.com](http://www.cusabio.com))

Sekundarno protutijelo korišteno za oba primarna monoklonska protutijela bilo GAM-AP koncentracije 0.25 µg/ml. Membrane su zatim ponovno isprane u blotto-puferu 3 puta po 10 min i u PBS 2 puta po 5 min. Nakon toga provedena je reakcija sa supstratom alkalne fosfataze, BCIP/NBT u alkalnom puferu (20 mM Tris, pH 9), pri čemu dolazi do pojave smeđe-ljubičaste boje. Razvoj obojenja posljedica je oksidacijske reakcije između alkalne fosfataze i supstrata BCIP/NBT na mjestima gdje se sekundarno protutijelo vezalo na primarno protutijelo vezano na antigen. U reakciji nastanka boje dolazi do odvajanja Pi od 5-bromo-4-kloro-3-indolila čijom oksidacijom nastaje indigo. Indigo zatim reducira NBT u diformazan uz nastajanje netopljivog smeđe-ljubičastog taloga. Intenzitet obojenja taloga proporcionalan je količini prisutnog antigena, što omogućuje denzitometrijsku procjenu sadržaja antigena u pojedinom uzorku.

#### **3.5.4. Denzitometrijska mjerenja**

Denzitometrijskim mjerenjima procijenjen je relativni sadržaj antigena u dobivenim prugama nakon western analize. Mjerenja su izvršena pomoću programa Image J (NIH, Bethesda, SAD). Mjerenja su rađena na način da se svaki uzorak u western analizi uokviri na jednakoj površini s proteinskom prugom i izvrši mjerenje gustoće obojenja. Prikazani rezultati predstavljaju relativne vrijednosti gustoće u odnosu na gustoću najintenzivnije obojene pruge (=1) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka. Prikazi rezultata western analize obrađeni su u programu Excel i Adobe Photoshop 6.0.

#### **3.5.5. Fiksiranje tkiva in vivo**

Životinje, oba spola, uspravane su odgovarajućim omjerom kombinacije anestetika (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p). Krvožilni sustav zatim im je perfundiran kroz srce, najprije PBS-om (zagrijanim na 37° i areiran smjesom plinova 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>) tijekom 2-3 minute u svrhu odstranjivanja krvi iz cirkulacije, a zatim fiksirajućim sredstvom (4% paraformaldehid), koje je svježe pripremljeno, tijekom 4-5 min. Izvađen je bubreg i poprečno narezan u više narezaka te dodatno fiksiran tijekom noći u istom fiksirajućem sredstvu na 4° C. Zatim su tkiva isprana u PBS-u 4 puta po 10 min i pohranjena na 4°C u PBS koji je sadržavao 0.02% NaN<sub>3</sub> kao konzervans do daljnje upotrebe.

### **3.5.6. Tkivni naresci i posredna imunofluorescencija**

Tkivni naresci pripremljeni su namakanjem fiksiranog uzorka tijekom nekoliko sati u 30% otopini saharoze u PBS-u zbog zaštite staničnih struktura od razaranja pri niskim temperaturama. Tkivo je uklopljeno u polimerni uklopni medij O.C.T. Compound 4583, smrznuto u kriostatu na temperaturu od -25° C, zatim narezano na nareške debljine 4 µm kriomikrotomom Leica CM 1580 te su dobiveni uzorci nalijepljeni na predmetna stakalca Superfrost/Plus Microscope slides.

Naresci bubrega fiksirani na predmetnim stakalcima najprije su rehidrirani namakanjem u PBS-u 10 min. Najpovoljnija procedura za obradu uzoraka utvrđena za optimalno imunohistokemijsko obilježavanje uključivala je obradu neionskim detergentima i kuhanje u citratnom puferu pH 6. Na nekim od narezaka obojene su i jezgre stanica Hoechst 33342 bojom u koncentraciji 0,01% tijekom 2 minute nakon čega su uzorci dodatno isprani.

### **3.5.7. Obrada uzoraka neionskim detergentima i kuhanje u citratnom puferu pH 6**

Nakon što su tkivni naresci rehidrirani u PBS-u tijekom 15 min, kuhani su u 10mM citratnom puferu pH 6 u četiri navrata po 5 min. Kuhanje u citratnom puferu provodi se kako bi epitopi postali dostupniji protutijelima. Nakon kuhanja, naresci su ostavljeni na hlađenju pri sobnoj temperaturi te nakon toga ponovno ispirani u PBS-u u tri navrata po 5 min, zatim su stavljeni u 0.5% otopinu Tritona-X-100 u PBS-u tijekom 15 min te nakon toga u 2% otopinu Tritona-X-100 u PBS-u tijekom 30 min. Nakon toga uzorci su ispirani u PBS-u dva puta po 5min. Uzorci su zatim inkubirani s 1% otopinom BSA u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi tijekom 30 min kako bi se blokiralo nespecifično vezanje protutijela. Nakon toga, napravljena je inkubacija uzoraka s primarnim protutijelom na feritin tijekom noći (12 h) na 4° C. Kako bi se isprala nespecifično vezana protutijela, uzorci su nakon inkubacije isprani s 0.1% otopinom Triton-X-100 u PBS-u tijekom 10 min i nakon toga dva puta po 5 min s PBS-om. Slijedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelom, DAM-CY3 (razrijeđeno prema uputi proizvođača s PBS-om u omjeru 1:400), u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata. Nespecifično vezana sekundarna protutijela isprana su u 0.1% otopini Triton-X-100 u PBS-u tijekom 10 min i zatim 2 puta u PBS-u tijekom 5 min. Na pojedinim uzorcima jezgre su bojane Hoechst 33342 bojom (Sigma Aldrich-Merck) u koncentraciji od 0,01% tijekom 2 minute, nakon čega su uzorci isprani

2 x 5 min u PBS-u. Preparati su zatim prekriveni medijem za očuvanje fluorescencije, otopinom Vectashield razrijeđenom 1:2 u alkalnom puferu (Tris pufer A za SDS-PAGE, pH 8.5) te pokrovnim stakalcem.

Tkivni naresci promatrani su fluorescencijskim mikroskopom OPTON III RS, uz korištenje SPORT RT Slider digitalne kamere i programa (Diagnostic instruments, Sterling Heightsa MI). Slike su obrađene računalnim programom Adobe Photoshop 6.0. Crvena CY3 fluorescencija je na prikazanim slikama pomoću programa Adobe Photoshop 6.0 pretvorena u crno bijelu.

### **3.5.8. Prikaz i statistička analiza podataka**

Rezultati western analize i imunohistokemijskih pokusa prikazani su reprezentativnim prikazom (slikom) za 4 neovisne eksperimentalne životinje. Imunohistokemijske slike prikazuju reprezentativne rezultate raspodjele unutarstaničnog feritina u bubrežnim kanalićima, a odabrane su subjektivnim probirom. Rezultati western analize prikazuju ukupnu količinu traženog proteina (sadržaj), a dodatno se utvrđuje raspodjela (distribucija) kao rezultat dobiven imunohistokemijskim metodama.

Navedeni rezultati imunokemijskih metoda moraju biti u korelaciji. Brojčani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SP), a podaci su statistički obrađeni Studentovim t-testom na razini vjerodostojnosti od 5%. Za statističku obradu i grafički prikaz korišten je računalni program Excel.

## **4. REZULTATI**

U nastavku slijede prikazi western analize koji upućuju na sadržaj teške i lake podjedinice feritina te imunohistokemijski prikazi koji potvrđuju rezultate dobivene western analizom i dodatno prikazuju raspodjelu feritinskih podjedinica u bubregu te razlike s obzirom na dob i spol životinja.

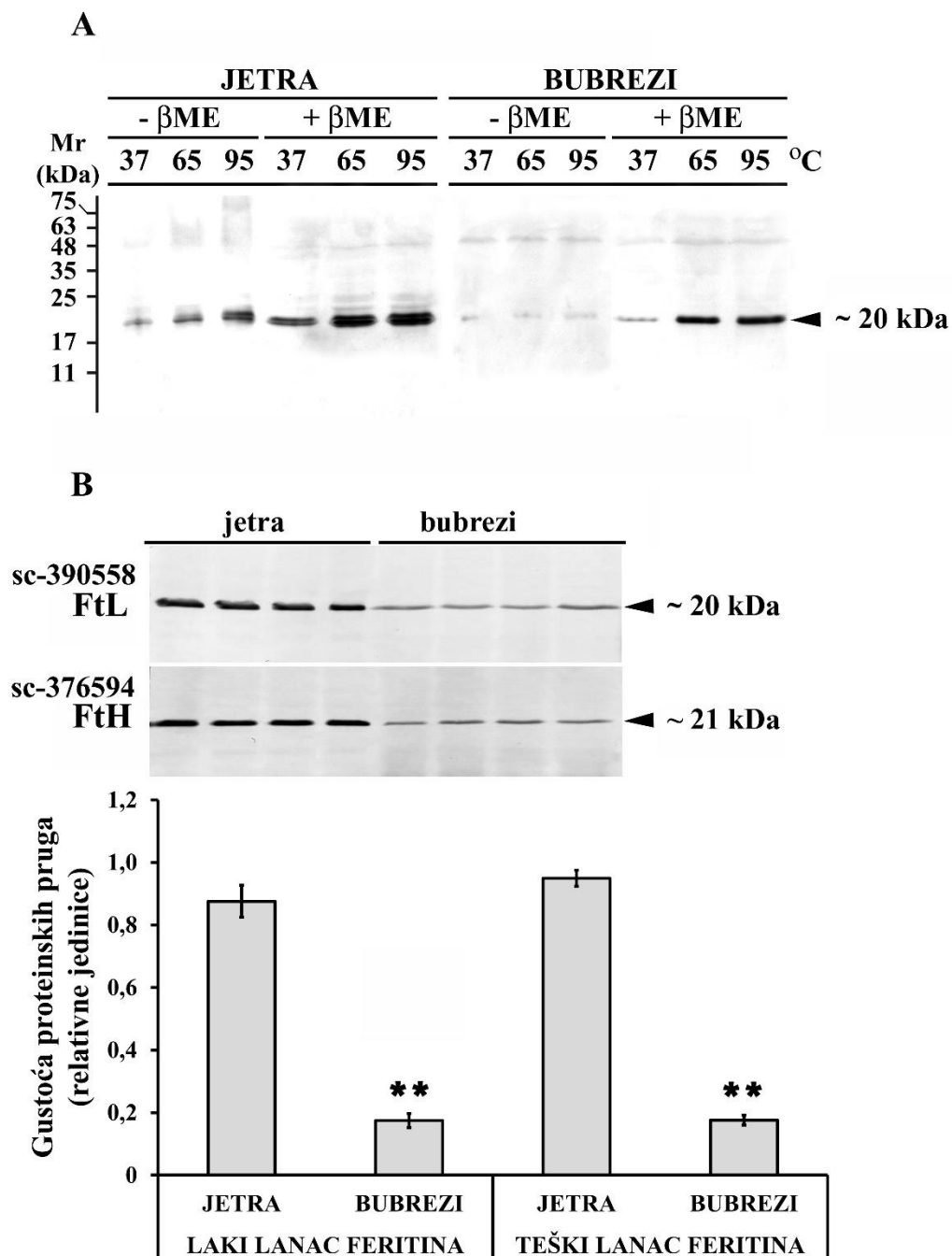
#### **4.1. KARAKTERIZACIJA PROTUTIJELA RAZVIJENIH PROTIV LAKOG I TEŠKOG LANCA FERITINA**

Kako bi se osigurala specifičnost protutijela u imunokemijskim metodama, te postigla maksimalna moguća učinkovitost obilježavanja, ispitani su optimalni uvjeti za vezanje protutijela za western analizu i imunohistokemijske metode.

Optimalni uvjeti za vezanje protutijela na laki lanac feritina (FtL) ispitani su na uzorcima bubrega i jetre štakora za western analizu. Uzorci su pripremani u reducirajućim uvjetima uz dodatak  $\beta$ -merkaptetanola te u nereducirajućim uvjetima, bez  $\beta$ -merkaptetanola i dodatno termički obrađeni pri različitim temperaturama tijekom različitog vremenskog perioda (95 °C tijekom 5 min, 65 °C tijekom 15 min i 37 °C tijekom 30 min). Najbolje obojenje dobiveno je obradom uzorka u reducirajućim uvjetima, s  $\beta$ ME, uz termičku obradu na 95 °C tijekom 5 minuta. Usporedbom intenziteta obojenja uočeno je intenzivnije obojenje proteinske pruge pri 20 kDa kod jetre nego kod bubrega, što odgovara lakom lancu feritina (FtL) (slika 13., A). Nakon utvrđivanja optimalnih uvjeta za protutijelo na FtL, na isti način ispitani su optimalni uvjeti za protutijelo na FtH te su dobiveni slični rezultati, odnosno utvrđeno je da su optimalni uvjeti za protutijelo na FtH jednaki (nije prikazano). Protutijela su u daljnjim ispitivanjima korištena su western analizi uzimajući u obzir navedene optimalne uvjete.

Western analiza lakog i teškog lanca feritina (sc-390558 (FtL) i sc-376594 (FtH) napravljena u uzorcima jetre i bubrega pokazala je proteinsku prugu na 20 kDa koja odgovara FtL, te prugu nešto jačeg intenziteta na 21 kDa koja odgovara FtH. Kvantifikacijom gustoće proteinskih pruga izmjerena je, statistički značajnija, dobivena ekspresija oba lanca feritina u jetri u odnosu na bubreg (slika 13., B).

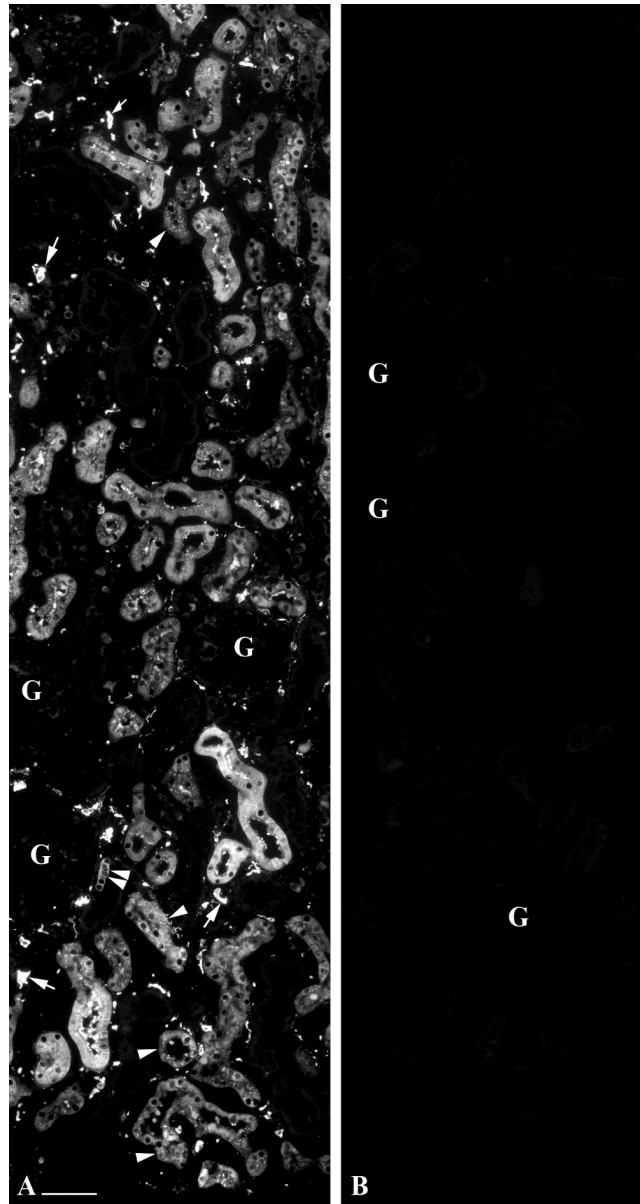




**Slika 13.** Određivanje uvjeta (A) za western analizu lakog lanca feritina (FtL) u uzorcima bubrega i jetre te usporedba jačine obojenja u jetri naspram bubrega štakora (B). Najbolji uvjeti za obradu uzoraka su reducirajući uvjeti, uz prisutnost  $\beta$ -merkaptetanola ( $\beta$ ME), uz termičku obradu pri 95 °C kroz 5 minuta (A). Western analiza lakog i teškog lanca feritina (sc-390558 (FtL) i sc-376594 (FtH)) u uzorcima jetre i bubrega te kvantifikacija uočenih razlika u ekspresiji

obje podjedinice feritina u ispitivanim organima. Proteinske pruge obiju feritinskih podjedinica su statistički značajno jače izražene u jetri naspram bubrega (B).

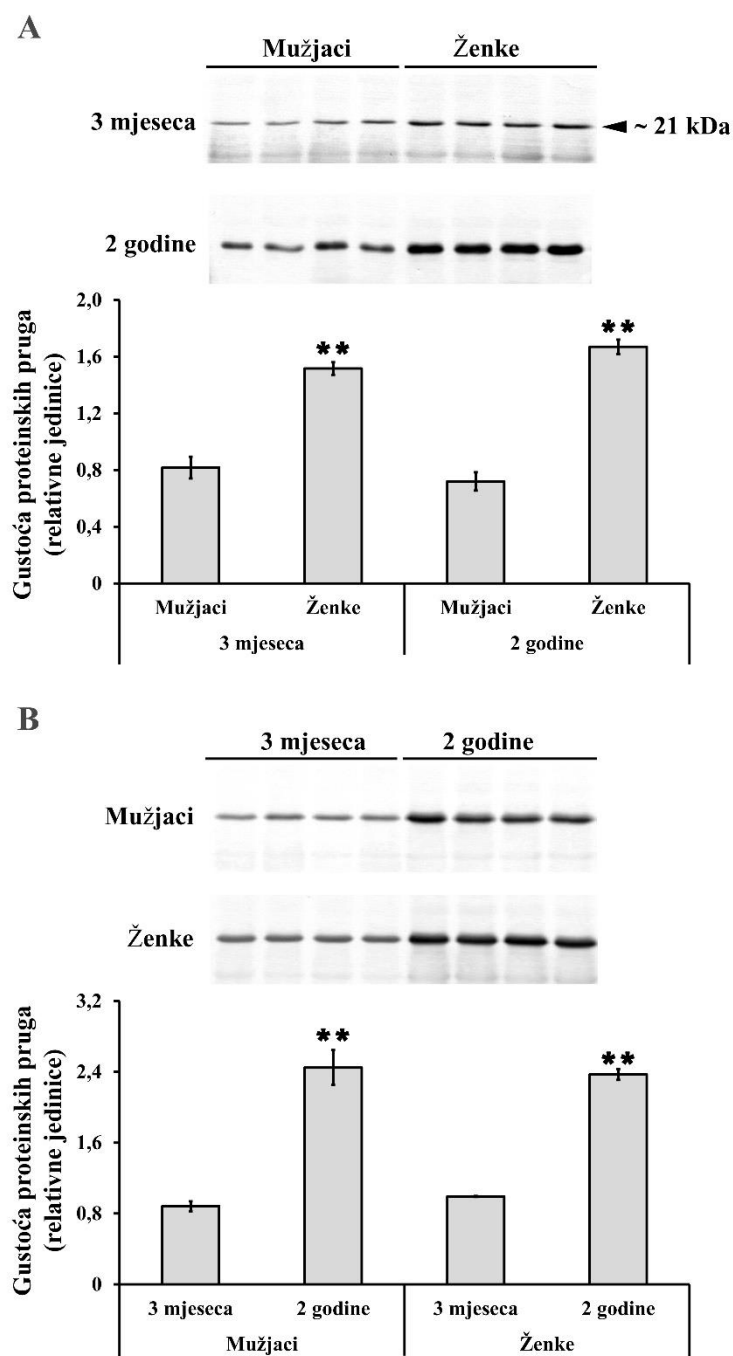
Za imunohistokemijske tehnike na konsektivnim narecima bubrega štakora ispitana su primarna protutijela za laki (D-1) i teški lanac (B-12) feritina te sekundarno protutijelo za detekciju, DAM-CY3. Pozitivno obojenje s oba protutijela zahtijevalo je dodatan postupak otkrivanja epitopa (*engl.* antigen retrieval) za koji su prethodno utvrđeni optimalni uvjeti bili kuhanje u citratnom puferu pH 6 te obrada različitim koncentracijama deterdženta T-X-100 čiji je postupak opisan u poglavlju 3.5.7. (nije prikazano). Uspoređeno je obojenje primarnim protutijelom za FtL (slika 14., A) i obojenje dobiveno inkubacijom samo s DAM-CY3 sekundarnim protutijelom (slika 14., B). Prikazano bijelo obojenje predstavlja crvenu fluorescenciju, a dokazuje intracelularnu prisutnost FtL u zavijenim proksimalnim kanalićima površinske kore. Intenzivno zrnato obojenje prisutno u nekim kanalićima vjerojatno potiče od fluorescencije feritina u lizosomima, a ono nije vidljivo bez primarnog protutijela (slika 14., B). Rezultati dobiveni obilježavanjem primarnim protutijelom za FtH usporedivi su (nije prikazano).



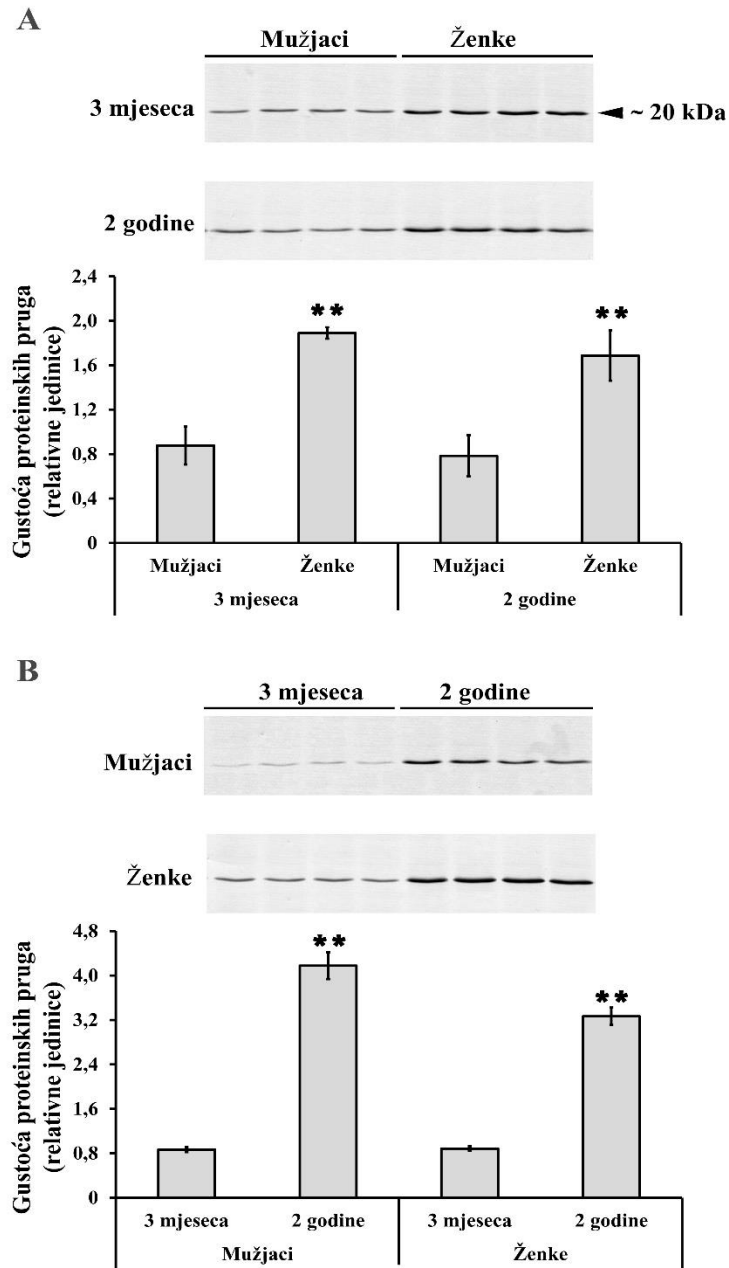
**Slika 14.** Usporedba obojenja primarnim FtL protutijelom (A) i samo DAM-CY3 sekundarnim protutijelom (B). Imunohistokemijski prikaz obojenja FtL kroz koru bubrega s proksimalnim kanalićima oko glomerula (G) štakora. FtL (bijelo obojenje predstavlja crvenu fluorescenciju CY3) je obojenjem prisutan difuzno intracelularno u zavijenim proksimalnim kanalićima površinske kore. Poneki kanalići ispunjeni su jakim zrnatim intracelularnim obojenjem (A, vrh strelice), koji vjerojatno potiču od fluorescencije feritina u lizosomima, a obojenje nije prisutno bez primarnog protutijela (B). Strukture koje se uočavaju na naresku nakon imunohistokemijske obrade moguće uključuju intersticijalne makrofage (A, strelica) i makulu densu (A, dupli vrh strelice). Mjera 50  $\mu\text{m}$ .

## **4.2. WESTERN ANALIZA EKSPRESIJE OBIJU PODJEDINICA FERITINA U BUBREGU S OBZIROM NA SPOL I DOB**

Western analizom dobivena je proteinska pruga na 21 kDa koja odgovara teškoj podjedinici feritina, odnosno pruga na 20 kDa odgovara lakoj podjedinici feritina, čime je potvrđena prisutnost obje podjedinice feritina u bubregu. Usporedbom gustoće proteinskih pruga kod mužjaka i ženki te usporedbom njihove gustoće kod tromjesečnih i dvogodišnjih životinja utvrđena je prisutnost spolnih i dobnih razlika. Nakon western analize, denzitometrijskim mjerenjima procijenjen je relativni sadržaj teške i lake podjedinice feritina, na temelju razlika u gustoći proteinskih pruga. Već kod tromjesečnih životinja uočena je značajna razlika u sadržaju teške i lake podjedinice feritina, oko 100%, odnosno dvostruko više u korist ženki u odnosu na mužjake, što je prikazano kvantifikacijom gustoće proteinske pruge dobivene western analizom. Usporedbom gustoće dobivenih proteinskih pruga kod tromjesečnih i dvogodišnjih životinja, potvrđeno je da se tijekom života povećava sadržaj feritina u bubregu kod oba spola, uz zadržavanje spolnih razlika (slika 15. i 16.).



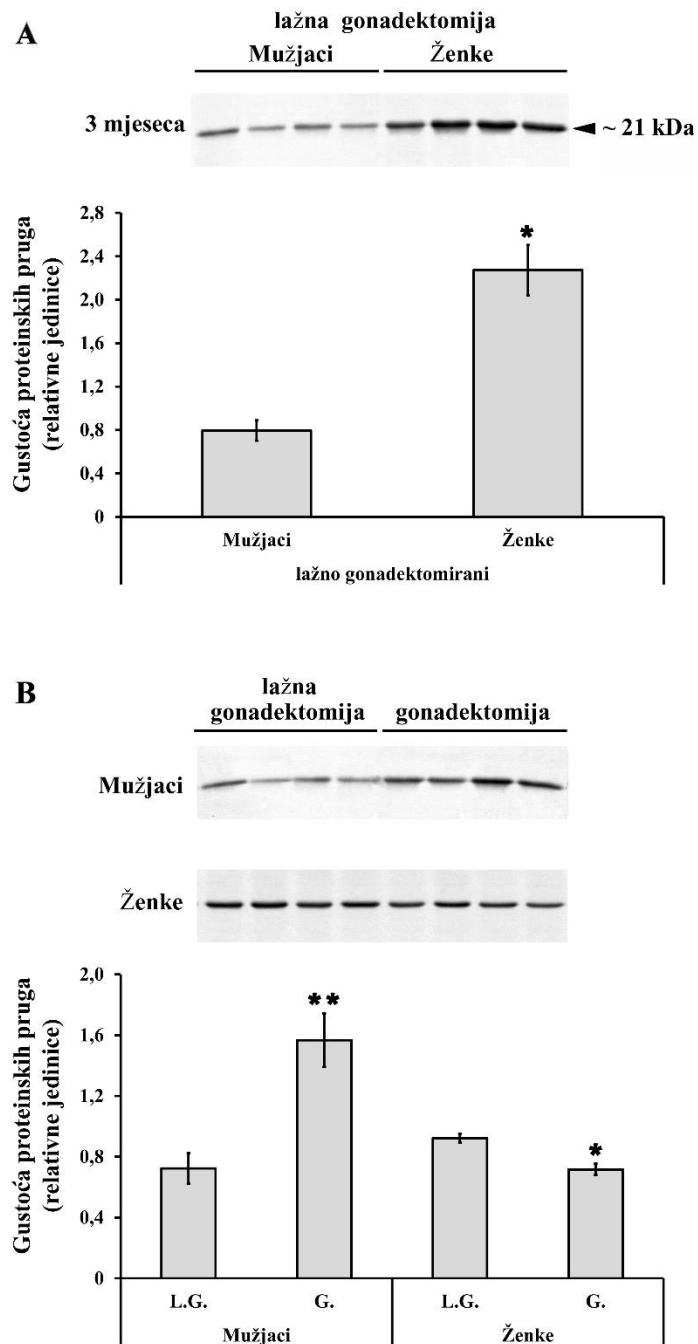
**Slika 15.** Prikaz rezultata western analize FtH u bubregu tromjesečnih i dvogodišnjih mužjaka i ženki te grafički prikaz relativne gustoće proteinskih pruga. Gustoća proteinskih pruga na 21 kDa ukazuje na veći sadržaj FtH u bubregu ženki u odnosu na mužjake u istoj dobi (A), te veći sadržaj FtH u bubregu dvogodišnjih životinja u odnosu na tromjesečne (B). Statistička značajnost dobivenih spolnih i dobnih razlika iznosi 99% ( $p < 0,001$ ).



**Slika 16.** Prikaz rezultata western analize FtL u bubregu tromjesečnih i dvogodišnjih mužjaka i ženki te prikaz relativne gustoće proteinskih pruga. Gustoća proteinskih pruga na 20 kDa ukazuje na veći sadržaj FtL u bubregu ženki u odnosu na mužjake u istoj dobi (A), te veći sadržaj FtL u bubregu dvogodišnjih životinja u odnosu na tromjesečne (B). Statistička značajnost dobivenih spolnih i dobnih razlika iznosi 99% ( $p < 0,001$ ).

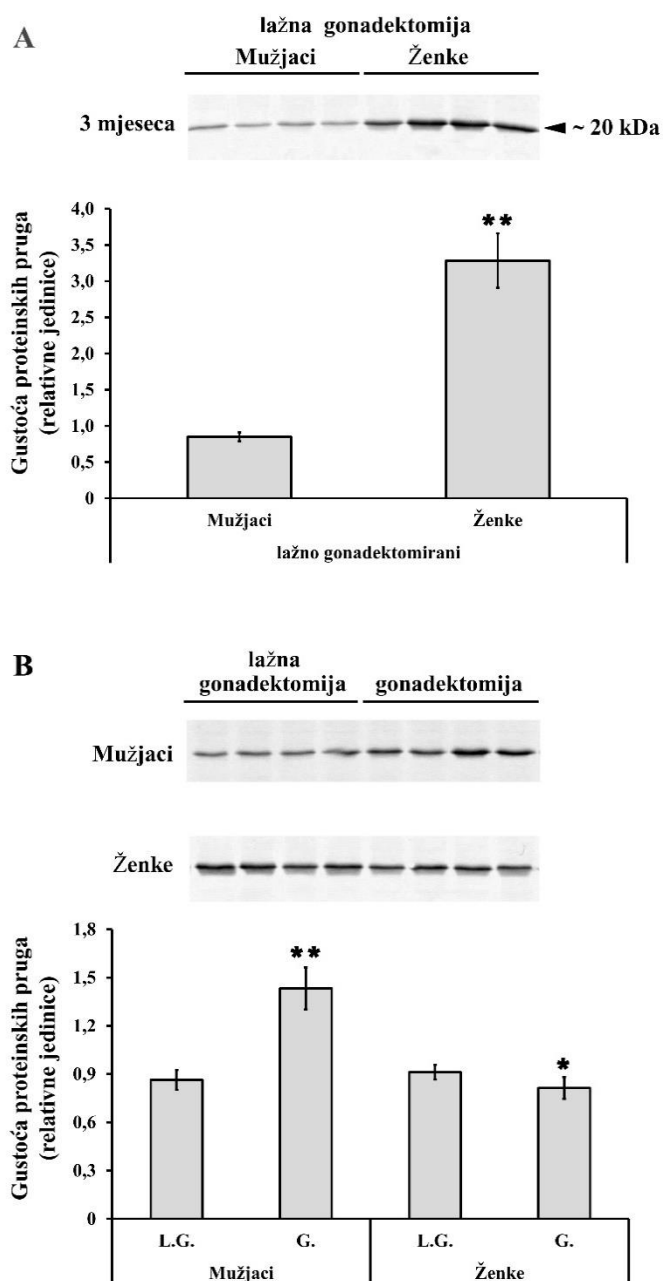
### **4.3. UTJECAJ GONADEKTOMIJE NA EKSPRESIJU TEŠKE I LAKE PODJEDINICE FERITINA U BUBREGU ŠTAKORA**

U svrhu ispitivanja utjecaja muških i ženskih spolnih hormona na razlike u sadržaju teškog i lakog lanca feritina, spolno zrelim, odraslim štakorima izvršen je postupak gonadektomije, odnosno uklanjanja spolnih žlijezda (ovarija i testisa). Kontrolnoj skupini životinja napravljen je postupak lažne gonadektomije u kojem su životinje prošle isti operativni postupak, ali bez odstranjivanja gonada. Dobiveni rezultati potvrđuju povezanost spolnih hormona s ekspresijom feritina u bubregu eksperimentalnih životinja. Usporedbom gustoće proteinskih pruga kontrolne skupine mužjaka i kastriranih mužjaka vidljivo je značajno povećanje sadržaja feritina u bubregu mužjaka. Ovarijektomija ženki uzrokovala je smanjenje gustoće proteinskih pruga u odnosu na kontrolnu skupinu ženki, što ukazuje na smanjenje sadržaja feritina u bubregu. Ovakvi su rezultati posljedica inhibitornog djelovanja testosterona na akumulaciju željeza i ekspresiju feritina, odnosno stimulacijskog djelovanja estrogena na skladištenje željeza (tablica 1.) i ekspresiju feritina (slika 17. i 18.).



**Slika 17.** Prikaz rezultata western analize FtH u bubregu lažno gonadektomiranih tromjesečnih mužjaka i ženki koje predstavljaju kontrolnu skupinu (A) te prikaz sadržaja FtH u bubregu životinja nakon gonadektomije (B). Gustoća proteinske pruge na 21 kDa ukazuje na veći sadržaj FtH u bubregu kastriranih mužjaka u odnosu na kontrolnu skupinu te manji sadržaj FtH u bubregu ovarijskiectomiranih ženki u odnosu na kontrolnu skupinu.



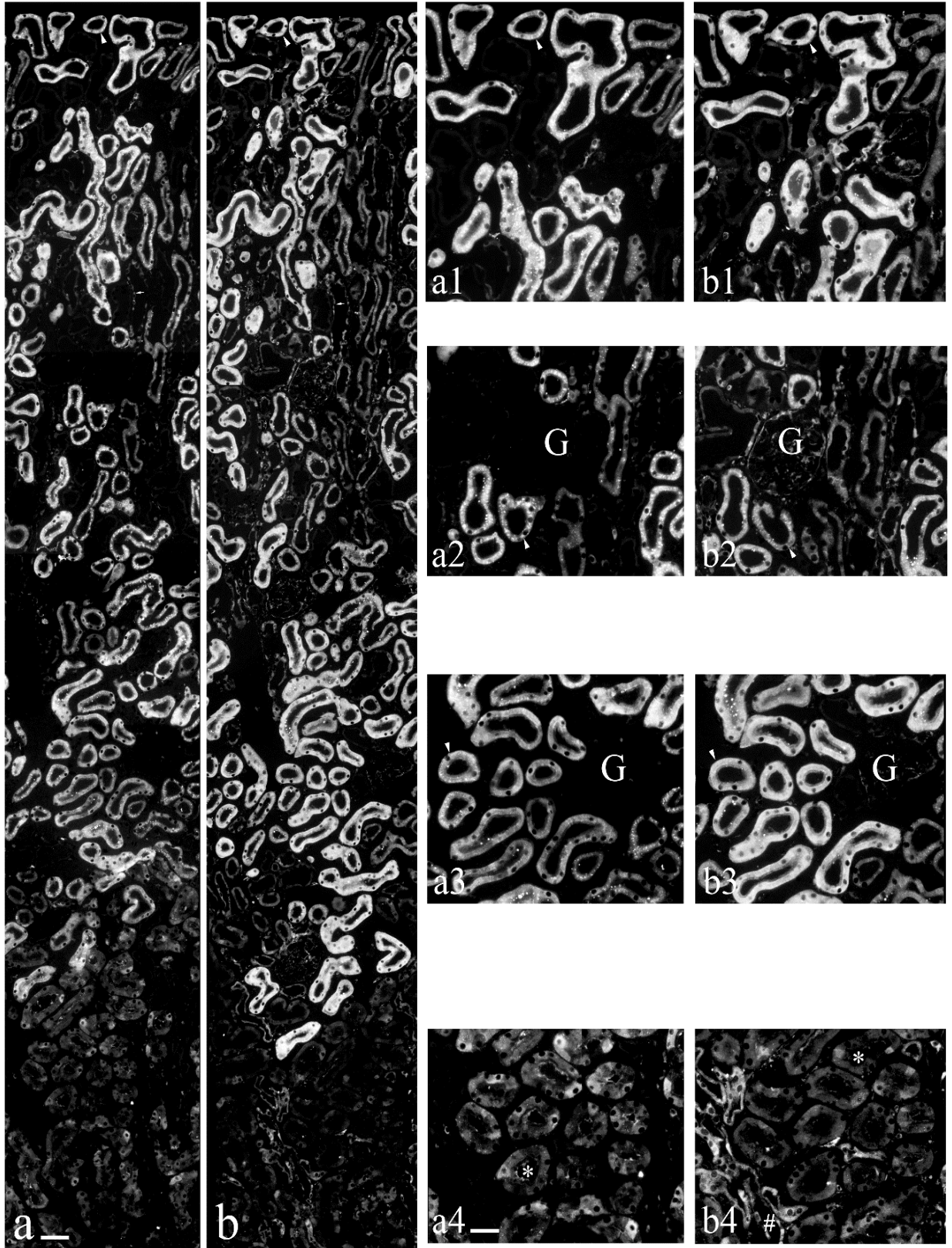


**Slika 18.** Prikaz rezultata western analize FtL u bubregu lažno gonadektomiranih tromjesečnih mužjaka i ženki koje predstavljaju kontrolnu skupinu (A) te prikaz sadržaja FtL u bubregu životinja nakon gonadektomije (B). Gustoća proteinske pruge na 20 kDa ukazuje na veći sadržaj FtL u bubregu kastriranih mužjaka u odnosu na kontrolnu skupinu te manji sadržaj FtL u bubregu ovarijskiectomiranih ženki u odnosu na kontrolnu skupinu.

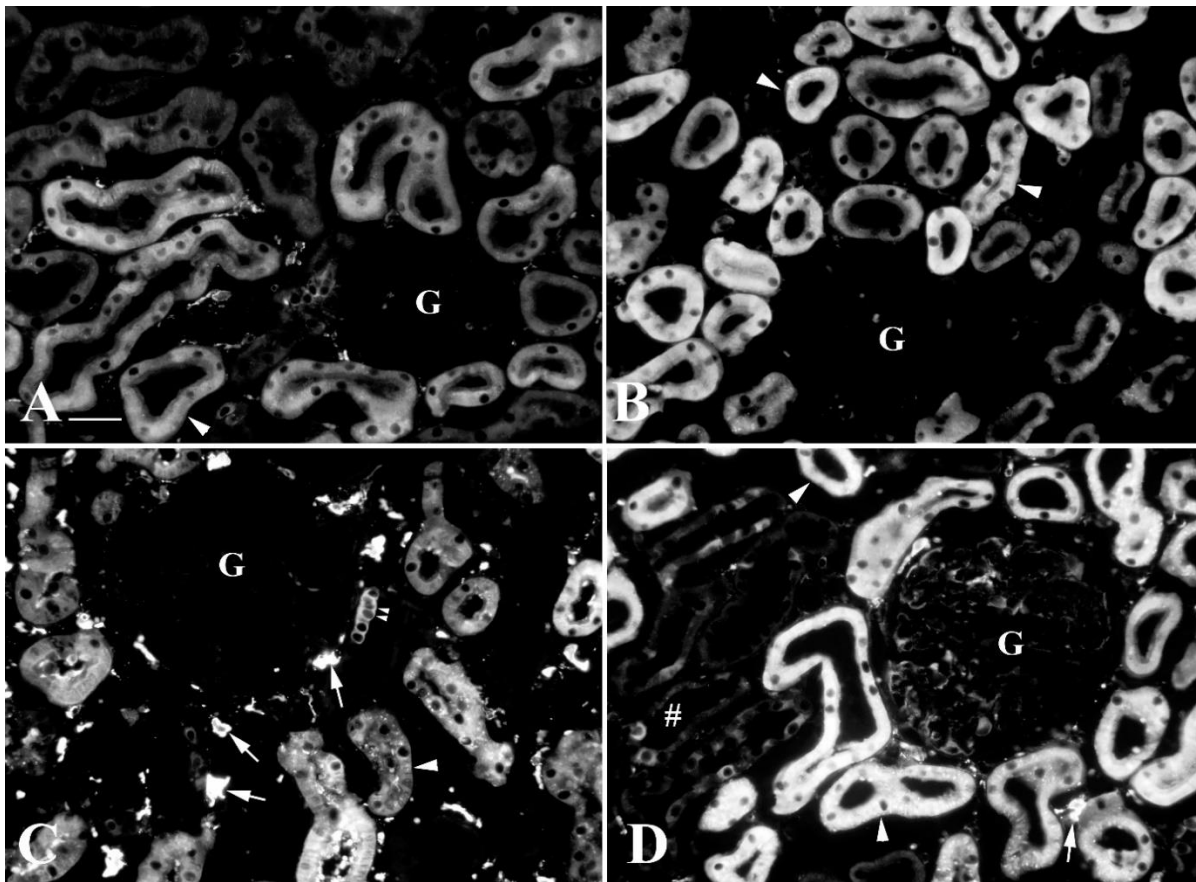
#### **4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKI PRIKAZ JAČINE I RASPODJELE OBOJENJA TEŠKE I LAKE PODJEDINICE FERITINA U BUBREGU S OBZIROM NA DOB I SPOL ŠTAKORA**

U svrhu ispitivanja spolnih i starosnih razlika u raspodjeli teške i lake podjedinice feritina, napravljene su kriosekcije bubrega odraslih mužjaka i ženki u dobi od tri mjeseca te starih životinja u dobi od dvije godine. Pripremljene kriosekcije bile su 4  $\mu$ m debljine, a neke od njih bile su konsektivni, odnosno sekvencijalni naresci. Za obilježavanje oba lanca feritina protutijelom napravljen je postupak otkrivanja epitopa (*engl.* antigen retrieval) u prethodno utvrđenim optimalnim uvjetima.

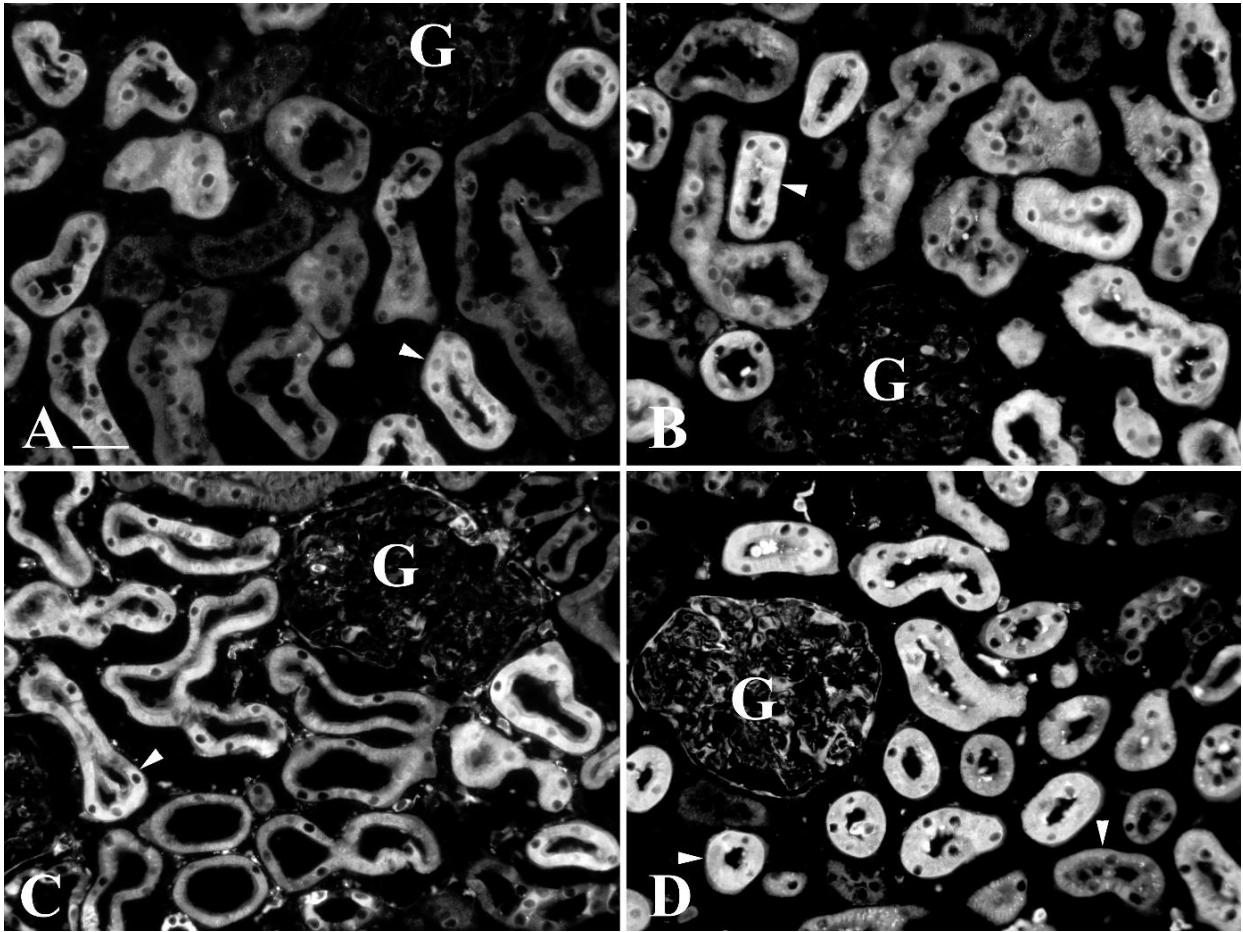
U nastavku su prikazani imunohistokemijski prikazi dobiveni obilježavanjem s protutijelima na FtL i FtH u bubregu eksperimentalnih životinja, koji prikazuju distribuciju oba lanca feritina u bubrežnim kanalićima. Usporedbom intenziteta obojenja uočeno je intenzivnije obojenje kod dvogodišnjih životinja u odnosu na tromjesečne te značajno intenzivnije obojenje kod ženki u odnosu na mužjake, što ukazuje na prisutnost dobnih, odnosno spolnih razlika.



**Slika 19.** Imunohistokemijski usporedni prikaz na sekvencijalnim naresecima obojenja FtL (a) i FtH (b) kroz bubreg odrasle ženke štakora. Oba feritinska protutijela snažnim obojenjem pokazuju unutarstanično prisustvo u svim proksimalnim kanalčićima kortikalnih (a1,2; b1,2) i jukstamedularnih (a3, b3) nefrona u kori bubrega uz prisutne intracelularne i intratubularne vezikule ispunjene feritinom odnosno obojenjem s oba protutijela (a1,2,3; b1,2,3, vrh strelice). U vanjskom tračku vanjske srži slabije su mozaično pozitivni S3 odsječci proksimalnih kanalića s ponekom jače obojenom epitelnom stanicom i pozitivnim obojenjem nad četkastom membranom epitelnih stanica (a4, b4, zvijezda). Sabirni kanalići koji prolaze regijom (a, b, strelica) također su pozitivni na obojenje s oba feritinska protutijela. U kortikalnoj i regiji vanjskog tračka vanjske srži bubrega mužjaka (nije prikazano) raspodjela obojenja duž nefrona je slična onom u ženke, ali je jačina obojenja u kori značajno slabija. Obojenje više struktura i kanalića feritinskim protutijelom za teški lanac uključuje endotel krvnih žila i glomerularni splet (G), te silaskom prema unutarnoj srži pozitivno jest obojenje tankog uzlaznog kraka Henleove petlje (b4, ljestve). Mjera a = 50  $\mu\text{m}$ ; a4 = 25 $\mu\text{m}$



**Slika 20.** Imunohistokemijski prikaz obojenja FtL u kori bubrega s proksimalnim kanalićima oko glomerula (G) odraslog i starog mušjaka (A, C) te odrasle i stare ženke (B, D) štakora. FtL (bijelo obojenje predstavlja crvenu fluorescenciju CY3) je u mušjaka obojenjem prisutan difuzno intracelularno u zavijenim proksimalnim kanalićima S1 i S2 odsjeka površinske kore. U odraslih ženki (B) FtL je također prisutan intracelularno u proksimalnim kanalićima S1 i S2 odsjeka površinske kore zamjetno snažnije jakosti uz poneke kanaliće ispunjene jakim zrnatim intracelularnim obojenjem (B, vrh strelice), koji vjerojatno potiču od fluorescencije feritina u lizosomima i obojenje nije prisutno bez primarnog protutijela (prikazano na slici 14. B). Jačina obojenja kod starih mušjaka (C) u proksimalnim kanalićima intenzivnija je nego u odraslih mušjaka (A) uz prisutne unutarstanične vezikule vjerojatno lizosome ili multivezikularna tijela. Strukture koje se uočavaju na naresku nakon imunohistokemijske obrade moguće uključuju intersticijalne makrofage (C, strelica) i makulu densu (C, dupli vrh strelice). Obojenje u kori starih ženki (D) je slično raspodjelom no snažnijeg intenziteta nego u odraslih ženki (B) i starih mušjaka (C). Na naresku se uočavaju pozitivno obojeni sabirni kanalići s mozaičkim pozitivnim bojanjem epitelnih stanica (D, ljestve) i endotel glomerularnog spleta (D, G). Mjera 25  $\mu$ m.



**Slika 21.** Imunohistokemijski prikaz obojenja FtH u kori bubrega s proksimalnim kanalićima oko glomerula (G) odraslog i starog mušjaka (A, C) te odrasle i stare ženke (B, D) štakora. FtH (crvena fluorescencija CY3) je u mušjaka obojenjem prisutan difuzno intracelularno u zavijenim proksimalnim kanalićima S1 i S2 odsječka površinske kore (A). U odraslih ženki (B) je FtH također prisutan intracelularno u proksimalnim kanalićima S1 i S2 odsječka površinske kore zamjetno snažnije jakosti uz poneke kanaliće ispunjene znatim intracelularnim obojenjem (B, vrh strelice), koji vjerojatno potiču od florescencije feritina u lizosomima i obojenje nije prisutno bez primarnog protutijela (slika 14., B). Obojenje u kori starih ženki (D) je slično raspodjelom no snažnijeg intenziteta i od odrasle ženke (B) i starog mušjaka (C). Na oba nareška iz starih životinja uočava se snažnije pozitivno obojeni endotel glomerularnog spleta (C i D, G). Mjera 25  $\mu\text{m}$ .

## **5. RASPRAVA**

Iako je jetra najviše proučavan organ u sisavaca koji pohranjuje željezo za potrebe organizma, bubrezi sa svojom ulogom održavanja homeostaze svih komponenti plazme potrebnih za funkcije stanica, organa i sustava, neminovno imaju ulogu u reapsorpciji i željeza koja se sve više prepoznaje u novijim istraživanjima (Meynard i sur., 2014; Smith i Thévenod, 2009; Thévenod i Wolff, 2016; Walker i Agarwal, 2016; Swaminathan, 2018; Scindia i sur., 2019). U kontekstu bazične biologije željeza, najznačajniju ulogu ima pohranjivanje tog esencijalnog prijelaznog metala u nanokaveze feritina zbog visoke reaktivnosti željeza koji prelascima kroz valentna stanja stvara ROS (Anderson i Frazer, 2017; Bresgen i Eckl, 2015; Andrews, 1999). Feritinski nanokavez je struktura koja u staničnom citosolu pohranjuje željezo i omogućava kroz feritinofagiju njegovo korištenje prema potrebi organizma. Građen od 24 podjedinice u konfiguraciji lopte iz dva proteinska lanca : teškog (FtH) i lakog lanca (FtL) feritina, koji pak svojom prisutnošću prate nakupljanje željeza u pojedinim organima pa tako i u bubregu (McCullough i Bolisetty, 2020; Balla i sur., 2019; Arosio i sur., 2017; Arosio i Levi 2010; Arosio i sur., 2009). Do sada nisu istražene obje podjedinice zasebno specifičnim protutijelima pri praćenju spolnih i starosnih razlika te učinaka gonadektomije, što čini ovaj rad.

U izoliranim homogenatima tkiva iz intaktnih i gonadektomiranih mužjaka i ženki štakora, praćena je promjena količine FtH i FtL na razini proteina western analizom. Protutijelo za FtL obilježilo je proteinsku prugu ~20 kDa u uzorcima homogenata izoliranim iz bubrega štakora. Intenzitet proteinske pruge ovisio je o temperaturi i uvjetima denaturacije, odnosno proteinska pruga bila je slabija uz nižu temperaturu denaturacije te bez prisustva reducirajućeg sredstva  $\beta$ -merkaptoetanol (βME), što ukazuje na osjetljivost feritinskog kompleksa u bubrezima na temperaturu i reducirajuće uvjete. Pri povišenoj temperaturi i u reducirajućim uvjetima feritinski se kompleks razdvaja na podjedinice, odnosno na teške i lake lance (slika 13., A). U literaturi koje navodi proizvođač protutijela, a koju potvrđuju prethodna istraživanja, proteini FtL i FtH u staničnim kulturama obilježavaju proteinsku prugu od 19-25 kDa (FtL), odnosno 21 kDa (FtH) što se slaže i s rezultatima navedenim u ovom radu gdje je pruga FtH na 21 kDa, a nešto niža proteinska pruga FtL na 19-20 kDa (~ 20 kDa) (slika 13., B) (SantaCruse data sheet sc-390558 (FtL) i sc-376594 (FtH)).



Obojenje proteinskih pruga je više od 4 puta jače u jetri nego u bubrezima kada su iste koncentracije proteina u pitanju, odražavajući ulogu feritina koji prati nakupljanje željeza u organima, koje je također oko 4x više u jetri nego u bubrezima (tablica 1.; slika 13., B). Nadalje, postojanje spolnih razlika potvrđeno je za ekspresiju FtH i FtL u odraslih štakora u korist ženki više od 100%, odnosno dvostruko (slika 15., A; 16., A), te su nađene jasne visoke starosne razlike u ekspresiji obje podjedinice feritina oko 3 puta za FtH i 4x za FtL što zahtijeva daljnje istraživanje (slika 15., B; 16., B). Također, kastracija odraslih mužjaka dovela je do povećanja ekspresije proteina obje podjedinice feritina, dok je ovarijektomija u odraslih ženki dovela do smanjenja njihove ekspresije (slika 17., B; 18., B).

Ovim istraživanjem potvrđena je prisutnost FtL i FtH u citosolu bubrežnih stanica, što je u skladu s očekivanom imunolokalizacijom u štakorskim i humanim epitelnim stanicama nefrona. Prikaz imunohistokemijskog obojenja sa i bez primarnog protutijela potvrđuje specifičnost obojenja bubrežnih narezaka s oba protutijela jer sekundarno protutijelo dijele (slika 14., A, B). Stanice bubrega, uz homogenu razinu obojenja u proksimalnim kanalićima, pokazuju i mozaično pojačano obojenje u nekim epitelnim stanicama drugih dijelova nefrona koje imaju povećanu ekspresiju i FtL i FtH. Budući da su oba monoklonska protutijela proizvedena u miša, nije bilo moguće provesti jednoznačnu kolokalizaciju na istom uzorku, zbog čega su korišteni konsekutivni krio naresci ženke te je zatim potražena i snimljena ista regija koja je jasno pokazala unutarstanično obojenje i ono se preklapalo u istim epitelnim stanicama nefrona u dva nareška u slijedu. Raspodjela FtL i FtH dobivena ovim istraživanjem u stanicama nefrona bubrega štakora odgovara u literaturi opisanoj ulozi feritinskog kompleksa u intracelularnoj pohrani željeza, uz obojenje više struktura u bubregu koje zahtijevaju daljnju detaljniju analizu.

Usporedni imunohistokemijski prikazi na sekvencijalnim narescima obojenja FtL i FtH kroz bubreg odrasle ženke štakora (slika 19., a, b) snažnom fluorescencijom pokazali su unutarstanično prisustvo u svim proksimalnim kanalićima kortikalnih (slika 19., a1,2, b1,2) i jukstamedularnih (slika 19., a3, b3) nefrona u kori bubrega uz prisutne intracelularne i intratubularne vezikule ispunjene feritinom, odnosno obojenjem s oba protutijela (slika 19., a1,2,3, b1,2,3, vrh strelice). Pretpostavka je da se radi o unutarstaničnom obojenju u lizosomima koji imaju i nespecifičan put egzocitoze kojim bi feritin mogao u većoj količini biti izlučen

unutar tubula nefrona. U vanjskom tračku vanjske srži slabije mozaično pozitivni bili su S3 odsječci proksimalnih kanalića s ponekom jače obojenom epitelnom stanicom i pozitivnim obojenjem nad četkastom membranom epitelnih stanica (slika 19., a4, b4, vrh strelice). Kako je nakon S3 odsječka proksimalnih kanalića intratubularno obojenje odsutno pretpostavka je da dolazi do snažne reapsorpcije pozitivnih vezikula u S3 odsječku što je u skladu s lokalizacijom megalin-kubilin-AMN (Thévenod i Wolff, 2016). Sabirni kanalići koji prolaze regijom (slika 19., a, b, zvijezda) također su bili pozitivni mozaičnim bojenjem epitelnih stanica na obojenje s oba feritinska protutijela. Navedeno mogu biti ili interkalirane ili principijelne stanice što se mora dalje razaznati dvostrukim obojenjem s V-ATPazom (pozitivnom u interkaliranim stanicama) i AQP2 (pozitivnim u principijelnim stanicama) (rad u tijeku u JMT IMI). Obojenje više struktura i kanalića feritinskim protutijelom za teški lanac uključivalo je endotel krvnih žila i glomerularni splet te silaskom prema unutarnjoj srži pozitivno je bilo i obojenje tankog uzlaznog kraka Henleve petlje (slika 19., b, b4, ljestve). Niti jedna od gore navedenih struktura nije bila pozitivno obojena na naretku bubrega bez primarnog protutijela (slika 14., A, B). Međutim značajnost tih nalaza, pogotovo kod starih životinja morat će proći detaljnu provjeru drugim protutijelima koji obilježavaju navedene strukture, a bili bi korisni i dodatni pokusi za model gomilanja željeza u tkivu, npr. suplementacijom ili pokušaj smanjenja kalorijskom restrikcijom.

Spolne i starosne razlike potvrđene su s oba protutijela i imunohistokemijski u kortikalnoj regiji, gdje je uočena slična raspodjela obojenja duž nefrona koja, premda je pokazivala nešto više struktura u starih mužjaka i ženki, jačina obojenja u proksimalnim kanalićima kore bubrega ipak je odražavala razlike koje su nađene western analizom (slika 15.; 16.). Međutim, višestruki porast sadržaja u starih životinja traži dodatna objašnjenja jer nije jednak za oba feritinska lanca. Tako FtH ima porast oko tri puta, što relativno odgovara porastu željeza u starih životinja (Cook i Yu, 1998; Widdowson i McCance, 1953), dok FtL ima porast od oko 4x u odnosu na tromjesečne životinje, što pak mijenja odnose podjedinica u tkivu. Vjerojatno je da količina FtL osim proksimalnih kanalića odgovara i uključuje druge strukture u bubrezima, ponajprije makrofage koje zbog snažnog intenziteta obojenja i intersticijske lokalizacije često izbjegavamo na reprezentativnim IHC slikama.

Imunohistokemijski prikaz obojenja FtL u kori bubrega s proksimalnim kanalčićima oko glomerula (G) odraslog i starog mušjaka (slika 20., A, C) te odrasle i stare ženke (slika 20., B, D) štakora u mušjaka dokazao je prisutnost FtL difuzno intracelularno u zavijenim proksimalnim kanalčićima S1 i S2 odsječka površinske kore. U odraslih ženki (slika 20., B) FtL je također bio prisutan intracelularno u proksimalnim kanalčićima S1 i S2 odsječka površinske kore, zamjetno snažnije jakosti, uz poneke kanaliće ispunjene zrnatim intracelularnim obojenjem (slika 20., B, vrh strelice), koji vjerojatno potiču od florescencije feritina u lizosomima i obojenje nije bilo prisutno bez primarnog protutijela (slika 14., B). Strukture koje se mogu uočiti kod starih mušjaka na naresku nakon imunohistokemijske obrade, moguće je da uključuju intersticijalne makrofage (slika 20., C, strelica) i makulu densu (slika 20., C, dupli vrh strelice). Obojenje nađeno u kori starih ženki (slika 20., D) slično je po raspodjeli no snažnijeg intenziteta. Na naresku se mogu uočiti pozitivno obojeni sabirni kanalići s mozaičnim, pozitivnim bojanjem epitelnih stanica (slika 20., D, ljestve) i endotel glomerularnog spleta (slika 20., D, G). Slično obojenje u raspodjeli i intenzitetu nađeno je i s FtH protutijelom (slika 21.). Kako duž nefrona bubrega postoji čitav niz specijaliziranih epitelnih stanica za pojedine reapsorpcijske i/ili sekrecijske funkcije, tako svaki pojedini novi nalaz mora biti dokazan sa sigurnošću te ujedno imati i fiziološku osnovu zbog koje se tamo nalazi, što za sada nije u potpunosti razjašnjeno. Primjer je makula densa, koja se ponaša kao senzor između primarnog urina i nizvodnih dijelova nefrona koji vrše reapsorpciju natrija i kalija, čime se regulira krvni tlak, pa sama ekspresija oba feritinska lanca u starih životinja indicira utjecaj nakupljanja željeza na regulaciju tlaka u starijoj dobi, što je vrlo zanimljiv nalaz pogotovo ako se na njega može utjecati farmakološki.

Glavna reapsorpcijska uloga bubrega odražava stanje u organizmu pa tako i spolne i starosne razlike u nakupljanju željeza (Kong i sur., 2014; Meynard i sur., 2014). Praćenje uočenih fizioloških spolnih razlika u nakupljanju željeza u jetri vrlo rano u istraživanju je uključilo i bubreg (Widdowson i McCance, 1953; 1948). Kao i u jetri, u kojoj mušjaci štakora skladište puno manje željeza nego ženke, tako i bubrezima filtriraju i reapsorbiraju puno manje željeza nego ženke. Iako prilikom rođenja imaju približno iste razine željeza u bubregu, ona se postnatalno smanjuje u prvih 15 dana, da bi nakon toga počela jednako rasti do trećeg mjeseca života, kada se uočavaju spolne razlike. Vjerojatno pod utjecajem steroidnih hormona tijekom spolnog sazrijevanja, kod ženki je nakupljanje željeza u jetri značajnije nego u mušjaka već

nakon prvih 60 dana života, nakon pet mjeseci željezo dostiže dvostruko veću razinu koja tijekom starenja nastavlja rasti, a u sedmom mjesecu života ženke imaju približno trostruko više željeza u jetri u odnosu na mužjake. U bubrezima su nagibi krivulje manji i razlike ne prelaze 2x u osmom mjesecu života. U pionirskim radovima dodatno je istraživano i postojanje spolnih razlika u jetri, u bubrezima i slezeni koje se povećavaju starenjem te zadržavaju i nakon tretmana željezom (Widdowson i McCance, 1953). Rezultati su slični i podudaraju se i s novijim istraživanjima spolnih razlika u nakupljanju esencijalnih metala, kao i utjecaja gonadektomije. Pri tome su spolne razlike ukupnog željeza dvostruko veće u korist ženki, ovarijektomija ženki smanjuje nakupljanje željeza u bubrezima, dok kastracija neznatno povećava količinu željeza u istraživanjima tromjesečnih životinja (Ljubojević i sur, 2019; Orct i sur, 2017). Feritinski kompleks, kao glavni skladišni protein željeza, stupa na istraživačku scenu dva desetljeća kasnije te se potvrđuje kao najbolji kandidat za pretpostavku da bi spolne razlike u nakupljanju željeza mogle rezultirati spolnim razlikama u ekspresiji odgovarajućih skladišnih proteina u citosolu stanica (Linder i sur., 1973; Bjørklid i Helgeland, 1970). U to vrijeme, potvrda navedenih pretpostavki dobivena je radijalnim imunodifuzijskim tehnikama i izolacijom feritina, proteina otpornog na povišenu temperaturu u uzorcima homogenata izoliranih iz bubrega eksperimentalnih životinja, gdje je nađena oko 3x veća količina feritinskog kompleksa kod ženki u usporedbi s mužjacima, a koja raste kod obje skupine tretmanom željezom, no ipak se zadržava dominacija kod ženki (Linder i sur., 1973). Novija istraživanja koja bi pratila ekspresiju obje podjedinice feritina pomoću specifičnih protutijela tijekom dužeg vremena prema dosad prikupljenim informacijama nisu provedena.

Ovim istraživanjem potvrđeni su nalazi spolnih razlika u ekspresiji obje podjedinice feritina koje očekivano prate ponašanje željeza (tablica 1., Ljubojević i sur., 2019) već u tromjesečnim životinjama, te je rezultatima dodan i utjecaj gonadektomije. Zapaženo je da ekspresija oba lanca feritina kastracijom raste, dok ovarijektomijom pada, čime je potvrđen utjecaj spolnih hormona na sadržaj feritina. Dakle, gonadektomijom se uočava trend smanjenja statističke značajnosti spolnih razlika u ekspresiji između podjedinica feritina. Nadalje, dodatne informacije koje proizlaze iz analize utjecaja starenja od dvije godine pri čemu, kao što je i očekivano s obzirom na nakupljanje željeza (Cook i Yu, 1998; Widdowson i McCance, 1953), razina feritina raste u odnosu na tromjesečne životinje, no spolne razlike u ekspresiji oba lanca

feritina ostaju očuvane. Veliki porast u ekspresiji lakog feritinskog lanca oko 4x ipak nije u potpunoj korelaciji s nakupljanjem željeza, koje doseže do dva puta višu razinu nego u mladim spolno zrelih životinjama. Moguć je uzrok više skladišnog feritina kojim dominira laki lanac posebno u makrofagima i endotelnim stanicama, čija se struktura pozitivno boji s FtL u starih životinja. Nadalje, kako je razgradnja feritina većinom zadatak lizosoma (Zhang i sur., 2010), moguća pretpostavka je da je jedan od uzroka nakupljanja feritina nedostatak funkcija lizosoma proksimalnih kanalića, ali i makrofaga u starih životinja. Naime obojenje u starih životinja pokazuje, uz jače obojenje proksimalnih kanalića i drugih pozitivnih struktura nefrona, i drastičan porast broja i intenziteta obojenih makrofaga. Njihova funkcija uklanjanja starih eritrocita starenjem također može prevladati kapacitet razgradnje u lizosomima što se u novije vrijeme povezuje sa starenjem stanica (Carmona-Gutierrez i sur., 2016; Terman i Kurz, 2013; Kurz i sur., 2007). Studija koju su Cook i Yu proveli 1998. samo na mužjacima štakora pokazala je da kalorijska restrikcija, koja aktivira autofagosomalni put i razgradnju lizosomima, smanjuje nakupljanje željeza i u jetri i u bubrezima, dok feritin u tom kontekstu nije istražen. Lizosomi, kao glavni organeli u kojima se odvija razgradnja svih suvišnih, oštećenih i nakupljenih tvari, postaju izvor reaktivnog željeza i oksidativnog stresa, ako ne funkcioniraju zajedno s autofagosomalnim putem, što se događa starenjem (Oliván i sur., 2014; Kurz i sur., 2007; Baird i sur., 2006). Ipak, generalno navedeni rezultati ukazuju da je nagomilano željezo u bubrezima tijekom starenja uskladišteno u nanokavezima feritina, a vrlo vjerojatno su u zaštiti stanice od metala i ROS uključeni i drugi inducibilni zaštitni proteini, kao metalotioneini (Ljubojević i sur., 2019 i neobjavljeni rezultati projekta AGEMETAR). Potvrda rezultata spolnih i starosnih razlika ekspresije obje podjedinice feritina novim imunokemijskim metodama može poslužiti kao temelj za daljnja fiziološka i toksikološka istraživanja, u kojima sadržaj željeza i posljedično feritina neminovno imaju ulogu. Spolne i starosne razlike morale bi biti utvrđene kao osnova za istraživanja na životinjama, jer su kod nekih sojeva miševa razlike u nakupljanju željeza pronađene dok ih kod nekih nema, što utječe na sva, a posebno toksikološka istraživanja (Hahn i sur., 2009). Thévenod i Wolff u preglednom članku objavljenom 2016., detaljno analiziraju odnos prijenosnika i transportnih puteva željeza u bubregu pri intoksikaciji kadmijem (Cd), koji nije Fenton reaktivni element, međutim njegova nefrotoksičnost uključuje nastanak ROS. Ipak, u navedenom radu potpuno izostaje obrada mogućnosti neposredne interakcije feritina i Cd, odnosno da željezo pohranjeno u feritinskom nanokavezu koji može primiti i Cd, može biti

istisnuto u citosol i time oslobođeno za nastanak ROS (Pavić i sur., 2019; Joshi i Zimmerman, 1988). Međudjelovanja prijelaznih esencijalnih i toksičnih metala, mehanizmi koji štite ili oštećuju stanicu, odnosno organizam te time imaju neposredan utjecaj na starenje i zdravlje, u fokusu su istraživanja dugi niz godina (Valko i sur., 2005), međutim neophodan je sistemski pristup praćenju glavnih esencijalnih elemenata i proteina koji ih prate kroz transport te u skladištenju i metabolizmu (Pavić i sur., 2019).

Osim za bitna saznanja o bazičnoj fiziologiji i biologiji metabolizma željeza (Scindia i sur., 2019; Swaminathan, 2018; Thévenod i Wolff, 2016; Walker i Agarwal, 2016; Smith i Thévenod, 2009) posebnost istraživanja metabolizma željeza u bubrezima naglašava se tek od nedavno, premda je njegova važnost uočena kroz patološka stanja, a najčešće kod akutnog bubrežnog zatajenja (*engl.* Acute Kidney Injury, AKI). AKI čest je klinički sindrom koji karakterizira iznenadno smanjenje u radu bubrega s posljedicama poremećaja u više bitnih fizioloških parametara, kao što su volumen i homeostaza elektrolita te proteini u urinu. Kroz razne modele navedenog stanja, utvrđena je uloga željeza u patogenezi te zaštita koju pruža povećana ekspresija feritina u tkivu bubrega, pogotovo FtH s feroksidaznom enzimskom aktivnošću neophodnom za sudjelovanje u obrani bubrega od reaktivnog željeza i zajedno s drugim inducibilnim enzimom hem-oksigenazom 1 (HO-1) (McCullough i Bolisetty, 2020; Balla i sur., 2019).

Iako brojna istraživanja potvrđuju postojanje spolnih razlika i ističu njihovu važnost, u biomedicinskim istraživanjima i dalje se dominantno provode studije na muškom spolu. Uključivanje ženskog spola u bazična istraživanja fiziologije i klinička ispitivanja smatra se nužnim za utvrđivanje utjecaja spola na osnovne biološke procese, patofiziologiju i kliničku sliku različitih stanja te potencijalno različitog odgovora na terapiju i mogućih o spolu ovisnih nuspojava. Ova su razmatranja posebno značajna kod bolesti kod kojih su spolne razlike utvrđene, ali ne i molekularni mehanizmi iz kojih one proizlaze, poput malignih, neurodegenerativnih te kardiovaskularnih bolesti (Oliván i sur., 2014). Posebnost fiziologije željeza u organizmu u tome je što se ono aktivno ne izlučuje, već se samo ograničeno apsorbira iz probavnog sustava kada je njegova količina dostatna za funkcioniranje organizma. Iako esencijalan element za organizam, u značajnoj mjeri ga i ugrožava stoga je precizna kontrola

njegovog sadržaja od iznimne važnosti za organizam (Anderson i Frazer, 2017; Finazzi i Arosio, 2014). Stanična homeostaza željeza temelji se na dobro koordiniranim mehanizmima apsorpcije, intracelularnog transporta, pohrane i iskorištavanja, koji u normalnim uvjetima osiguravaju adekvatan odgovor na zahtjeve organizma za željezom, a u uvjetima stresa dolazi do promjene ove dinamike u cilju zaštite stanice od štetnih učinaka (Bresgen i Eckl, 2015). Iako sam proces katabolizma feritina i iskorištavanja u njemu pohranjenog željeza još nije u potpunosti istražen, aktivno se istražuje uloga ostalih proteina koji su s feritinskom kompleksom u interakciji. Homeostaza željeza u ljudskom organizmu neposredno je vezana uz homeostazu cinka i bakra koji su prisutni u red do dva manjoj količini. Međutim, više se proteina uključenih u metabolizam željeza regulira kroz ekspresiju prototipnog aktivnog „zinc finger“ transkripcijskog faktora MTF1 (*engl.* Metal responsive transcription factor 1) (Rutherford i Bird, 2003). Međusobna interakcija između ovih prijelaznih metala te proteina koji ih skladište može narušiti ravnotežu ovih metala, čime se pokreću potencijalno toksične reakcije koje oštećuju stanice, ali i čitave organe (Atrian i Capdevila, 2013). Poremećaji homeostaze željeza i njegova akumulacija u organizmu, praćeni promjenama u sadržaju feritina, obilježje su brojnih bolesti, posebno neurodegenerativnih, iako još nije sa sigurnošću utvrđeno je li disbalans željeza direktan uzrok ili se javlja kao sekundarni učinak drugih patoloških mehanizama (Biasiotto i sur., 2016). Produljenje životnog vijeka populacije ima značajan utjecaj na razvoj neurodegenerativnih bolesti kod starijih, a sve veću ulogu u razjašnjavanju ovakve patofiziologije zauzima metabolizam i međusobna interakcija prijelaznih metala. Akumulacija željeza povezuje se s Parkinsonovom i Alzheimerovom bolešću, gdje je željezom induciran oksidativni stres i smanjen antioksidativni kapacitet uzročnik oštećenja živčanih stanica i neurodegeneracije (Uranga i Salvador, 2018). Smatra se kako su žene nakon menopauze pod povećanim rizikom od razvoja Alzheimerove bolesti, zbog naglog pada estrogena, za kojeg se drži da ima neuroprotektivnu ulogu (Congdon, 2018). Molekularni mehanizmi u pozadini spolnih razlika u feritinskoj ekspresiji još nisu poznati, ali dosadašnja istraživanja pokazuju i kardioprotektivno djelovanje estrogena, zbog čega su kardiovaskularne bolesti kod muškaraca češće lošijeg ishoda (Shapiro i sur., 2017). Redoviti gubitak krvi menstrualnim ciklusom, a time i željeza, čini žene podložnijima razvoju deficijencija željeza i anemijama, ali iz istog su razloga je moguće da su one manje podložne izložene bolestima koje u pozadini imaju nakupljanje željeza, poput nasljedne hemokromatoze, najčešće genetske bolesti sjeverne Europe i Amerike (Gozzelino i

Arosio, 2015; Andersen i sur., 2004). Povećan oksidativni stres, koji je posljedica akumulacije viška željeza ili manjka skladišnih proteina koji služe kao zaštita, može biti uzrok ili posljedica svih spomenutih stanja. Iako su osnovne informacije o fiziologiji čovjeka već dugo poznate, podaci o spolnim razlikama metala i točni molekularni procesi njihove interakcije nedostaju kao podloga objašnjenja razlika u prevalenciji brojnih bolesti između muškaraca i žena, uočenih na populacijskim studijama. Novija istraživanja sve više ukazuju na važnost autofagije i feritinofagije u procesima recikliranja i iskorištavanja željeza (Biasiotto i sur., 2016; Cao i Dixon, 2016; Carmona-Gutierrez i sur., 2016), a njegovo nakupljanje i oštećenja koja pritom stvara potencijalno igraju važnu ulogu u patofiziologiji neurodegenerativnih bolesti i starenja (Congdon, 2018). Budući da preživljavanje organizma ovisi o sposobnosti održavanja ravnoteže između proizvodnje i razgradnje oštećenih i potencijalno štetnih proteina i staničnih struktura, pretpostavlja se da starenje može biti posljedica progresivne disfunkcije lizosoma, a time i procesa autofagije (Carmona-Gutierrez i sur., 2016). Ovaj rad potvrđuje utjecaj spolnih razlika na ekspresiju obje podjedinice feritina u bubregu, što odražava sadržaj željeza u tom organu te prati ekspresiju obje podjedinice feritina ovisno o dobi eksperimentalnih životinja. Uočena povećana ekspresija FtL u odnosu na FtH u starih životinja oba spola zahtijeva daljnja istraživanja. Naime, osim očekivanih proksimalnih kanalića bubrega, snažna obojenja uključuju i druge strukture, koje su nedovoljno opisane u kontekstu feritina, no ne i nakupljanja željeza, primjerice makrofagi i endotel krvnih kapilara. Iako se važnost metabolizma željeza, ali i ostalih esencijalnih prijelaznih metala u brojnim radovima ističe u različitim procesima u stanicama i organizmima, istraživanja u čijem je fokusu povezivanje sadržaja više prijelaznih metala, njihovih spolnih razlika i procesa starenja još uvijek nedostaje.



## **6. ZAKLJUČAK**

1) Western analizom utvrđene su specifičnosti komercijalnih protutijela za FtL i FtH na aminokiselinski slijed čovjeka koji je visoko homologan štakorskom i može se koristiti u istraživanjima na modelu spolnih i starosnih razlika Wistar štakora. Jasne uske, neglikozilirane proteinske pruge obilježene u homogenatima jetre i bubrega štakora bile su odgovarajuće veličine, 21 kDa za FtH i 20 kDa za FtL u reducirajućim uvjetima, bolje izražene pri povišenoj temperaturi. Obje su podjedinice feritina, prema očekivanju, izražene i u bubrezima i u jetri te postoje značajne razlike između količine proteina, pri čemu ih jetra ima više sukladno s razlikom u količini željeza u njima.

2) Imunohistokemijska raspodjela obojenja s oba protutijela u bubrezima štakora nađena je prema očekivanom u proksimalnim kanalićima, premda i u nekim drugim strukturama koje se ne spominju u do sada objavljenoj literaturi, te zahtijevaju daljnju detaljnu analizu. Tako na primjer do izražaja dolazi, u korelaciji s većim nakupljanjem željeza starenjem, obojenje makrofaga u intersticiju s FtL protutijelom kao i obojenje makule dense i endotela krvnih žila s oba protutijela. Imunohistokemijski, obojenje citosola epitelnih stanica nefrona s FtL i FtH odgovara predviđenoj raspodjeli feritina u stanicama, premda ponovo u korelaciji s većim nakupljanjem željeza starenjem, uočavamo substanične strukture i lokalizacije, kao npr. u lizosomima ili subapikalno, pa čak u velikim vezikulama intratubularno.

3) Usporedbom ekspresije FtL i FtH *in vivo* u oba spola štakora dobivene su spolne razlike u korist ženki. Rezultat je u skladu sa spolnim razlikama u količini željeza u bubrezima objavljenom u literaturi. Povećana količina željeza u ženki uzrokuje, osim jačeg intenziteta obojenja citosola proksimalnih kanalića, i nešto bogatije obojenje prethodno navedenih struktura bubrega.

4) Gonadektomijom eksperimentalnih životinja nađene su slične promjene u ekspresiji FtL i FtH u bubregu. Nakon kastracije mužjaka, nađen je djelomičan porast ekspresije obiju podjedinica feritina kod odraslih mužjaka, dok je ovarijektomijom odraslih ženki došlo do značajnog pada ekspresije praćenih proteina u bubregu štakora. Ovi rezultati također su u skladu s dosad u literaturi opisanom utjecajem gonadektomije na sadržaj željeza u bubrezima.

5) Stare, dvogodišnje životinje također pokazuju izražene spolne razlike u ekspresiji oba lanca feritina. U usporedbi s odraslim tromjesečnim životinjama, dvogodišnje životinje oba spola pokazuju značajan višestruk porast u ekspresiji obje podjedinice feritina, pri čemu je porast ekspresije FtL nesrazmjern s porastom željeza u bubrezima objavljenom u literaturi.

6) Rezultati ukazuju da u odraslih životinja postoje značajne spolne i starosne razlike u ekspresiji obje podjedinice feritina izražene u bubrezima u korist ženki te da se snažno pojačavaju starenjem. Spolne razlike određuje stimulacijski učinak estrogena i inhibicijski učinak androgena. Spolne razlike očuvane su i kod starih životinja, a porast ekspresije FtL naspram tromjesečnih životinja nadržava nakupljanje željeza u bubrezima, dok se uloga spolnih hormona tek mora utvrditi (neobjavljeni rezultati HRZZ projekta AGEMETAR, IP-11-2013-1481). Svi dobiveni rezultati sukladni su s funkcijom feritinskog kompleksa u pohrani reapsorbiranog željeza u bubrezima štakora i obrani od ROS, no nakupljanje FtL starenjem izlazi iz tog okvira i traži daljnja objašnjenja.

7) Korišteni model spolnih i starosnih razlika eksperimentalnih životinja štakora pokazao se izuzetan za neophodno *in vivo* utvrđivanje bazične fiziologije, ne samo nakupljanja željeza, već otvara mogućnost daljnjeg istraživanja spolnih i starosnih razlika u djelovanju lijekova, suplemenata i toksičnih tvari. Spolne i starosne razlike fiziološka su baza, kojoj još nisu proučeni svi detalji, a neminovno utječe na odgovor organizma pri tretmanu farmaceutskim lijekovima, suplementima i toksičnim tvarima.

## **7. LITERATURA**

Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M, Birgens H, Nordestgaard BG. Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood*, 2004, 103, 2914-2919.

Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*, 2017, 106, 1559S-1566S.

Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 1999, 341, 1986-1995.

Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, 2017, 69, 414-422.

Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790, 589-599.

Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800, 783-792.

Atrian S, Capdevila M. Metallothionein-protein interactions. *Biomol Concepts*, 2013, 4, 143-160.

Baird SK, Kurz T, Brunk UT. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J*, 2006, 394, 275-283.

Balla J, G Balla, A Zarjou :Ferritin in Kidney and Vascular Related Diseases: Novel Roles for an Old Player. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 12, 96

Biasiotto G, Di Lorenzo D, Archetti S, Zanella I. Iron and Neurodegeneration: Is Ferritinophagy the Link?. *Mol Neurobiol*, 2016, 53, 5542-5574.

Bjørklid E, Helgeland L. Sex differences in the ferritin content of rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1970, 221, 583-592.

Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800, 719-731.

Bresgen N, Eckl PM. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules*, 2015, 5, 808-847.

Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73, 2195-2209.

Carmona F, Palacios O, Gálvez N, Cuesta R, Atrian S, Capdevila M, Domínguez-Vera JM. Ferritin iron uptake and release in the presence of metals and metalloproteins: Chemical implications in the brain. *Coordination Chemistry Reviews*, 2013, 257, 2752-2764.

Carmona-Gutierrez D, Hughes AL, Madeo F, Ruckenstein C. The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Res Rev*, 2016, 32, 2-12.

Congdon EE. Sex Differences in Autophagy Contribute to Female Vulnerability in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 2018, 12, 372.

Cook CI, Yu BP. Iron accumulation in aging: Modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev*, 1998, 102, 1–13.

Finazzi D, Arosio P. Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol*, 2014, 88, 1787–1802.

Frazer DM., Anderson GJ. The regulation of iron transport. *BioFactors*, 2014, 40, 206-214.

Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev*, 2013, 93, 1721–1741.

Garner B, Roberg K, Brunk UT. Endogenous ferritin protects cells with iron-laden lysosomes against oxidative stress. *Free Radical Research*, 1998, 29, 103-114.

Gozzelino R, Arosio P. The importance of iron in pathophysiologic conditions. *Front Pharmacol*, 2015, 6, 26.

Hahn P, Song Y, Ying G, He X, Beard J, Dunaief JL. Age-dependent and gender-specific changes in mouse tissue iron by strain. *Experimental Gerontology*, 2009, 44, 594-600.

He D, Marles-Wright J. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology. *New Biotechnology*, 2015, 32, 651-657.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camasella C. Two to tango: Regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*, 2010, 142, 24-28.

Joshi JG, Zimmerman A. Ferritin: an expanded role in metabolic regulation. *Toxicology*, 1988, 48, 21-29.

Kong WN, Niu QM, Ge L, Zhang N, Yan SF, Chen WB, Chang YZ, Zhao SE. Sex differences in iron status and hepcidin expression in rats. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 160, 258-267.

Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 462, 220-230.

Linder MC, Moor JR, Scott LE, Munro HN. Mechanism of sex difference in rat tissue iron stores. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 297, 70-80.

Linder MC. Mobilization of Stored Iron in Mammals: A Review. *Nutrients*, 2013, 5, 4022-4050.

Ljubojević M, Orct T, Micek V, Karaica D, Jurasović J, Breljak D, Madunić IV, Rašić D, Jovanović IN, Peraica M, Gerić M, Gajski G, Oguić SK, Rogić D, Nanić L, Rubelj I, Sabolić I. Sex-dependent expression of metallothioneins MT1 and MT2 and concentrations of trace

elements in rat liver and kidney tissues: Effect of gonadectomy. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 53, 98-108.

Mancias J, Wang X, Gygi S, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, 2014, 509, 105- 109.

McCullough K , S Bolisetty . Ferritins in Kidney Disease. *Semin Nephrol*, 2020, 40, 160-172.

Meynard D, Babitt JL, Lin HY. The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood*, 2014, 123, 168-176.

Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*, 2017, 168, 344-361.

Nakamura T, Naguro I, Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2019, 1863, 1398-1409.

Nakatani S, Nakatani A, Ishimura E, Toi N, Tsuda A, Mori K, Emoto M, Hirayama Y, Saito A, Inaba M. Urinary Iron Excretion is Associated with Urinary Full-Length Megalin and Renal Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43, 458-470.

Oliván S, Calvo AC, Manzano R, Zaragoza P, Osta R. Sex differences in constitutive autophagy. *Biomed Res Int*, 2014.

Orct T, Jurasović J, Micek V, Karaica D, Sabolić I. Macro- and microelements in the rat liver, kidneys, and brain tissues; sex differences and effect of blood removal by perfusion in vivo. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, 40, 104-111.

Pavić M, Turčić P, Ljubojević M. Forgotten Partners and Function Regulators of Inducible Metallothioneins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2019, 70, 256-264.

Philpott CC, Jadhav S. The ins and outs of iron: Escorting iron through the mammalian cytosol. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 133, 112-117.

Rutherford JC, Bird AJ. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*, 2004, 3, 1–13.

Scindia Y, J Leeds, S Swaminathan. Iron Homeostasis in Healthy Kidney and its Role in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*, 2019, 39, 76-84.

Shapiro JS, Chang HC, Ardehali H. Iron and Sex Cross Paths in the Heart. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6.

Smith CP, Thévenod F. Iron transport and the kidney. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790, 724-730.

Smith MC, Otis L. Sex variations in the utilization of iron by anemic rats. *Science*, 1937, 85, 125-126.

Stein J, Hartmann F, Dignass A. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7, 599–610.

Steinbicker A, Muckenthaler MU. Out of balance- systemic iron homeostasis in iron related disorders. *Nutrients*, 2013, 5, 3034-3061.

Swaminathan S. Iron Homeostasis Pathways as Therapeutic Targets in Acute Kidney Injury. *Nephron.*, 2018, 140, 156-159.

Terman A, Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18, 888-898.

Thévenod F, Wolff NA. Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. *Metallomics*, 2016, 8, 17-42.

Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 2002, 99, 3505-3516.

Uranga RM, Salvador GA. Unraveling the Burden of Iron in Neurodegeneration: Intersections with Amyloid Beta Peptide Pathology. *Oxid Med Cell Longev*, 2018.

Walker VJ, Agarwal A. Targeting iron homeostasis in acute kidney injury. *Semin Nephrol.*, 2016, 36, 62-70.

Watt RK, Hilton RJ, Graff DM. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800, 745-759.

Widdowson EM, McCance RA. Sexual differences in the storage and metabolism of iron. *Biochem J*, 1948, 42, 577-581.

Widdowson EM, McCance RA. The effect of dosage on sexual differences in the iron metabolism of rats. *Biochem J*, 1953, 53, 173-177.

Xu J, Jia Z, Knutson MD, Leeuwenburgh C. Impaired iron status in aging research. *Int J Mol Sci.*, 2012, 13, 2368-2386.

Zecca L, Youdim M, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5, 863–873.

Zhang Y, Mikhael M, Xu D, Li Y, Soe-Lin S, Ning B, Li W, Nie G, Zhao Y, Ponka P. Lysosomal proteolysis is the primary degradation pathway for cytosolic ferritin and cytosolic ferritin degradation is necessary for iron exit. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13, 999-1009.



## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

## SAŽETAK

Iako glavnu skladišnu ulogu željeza u organizmu ima jetra, bubrezi filtracijom i reapsorpcijom održavaju stanje opće homeostaze, ali i homeostaze prijelaznih metala u organizmu. U bubrezima štakora, kao i u jetri, sadržaj željeza pokazuje spolne i starosne razlike u korist ženki naspram mužjaka, a starenjem se povećava. Željezo se pohranjuje u obliku feritinskog kompleksa, odnosno nanokaveza građenog od ukupno 24 podjedinice. Laki (FtL) i teški (FtH) lanci formiraju šuplju sferu koja može pohraniti i do 4500 atoma željeza u bioraspoloživom obliku. Spolne i starosne razlike u nakupljanju željeza u jetri i bubrezima utvrđene su najranijim istraživanjima i naknadno povezane s razinom feritina koji ga pohranjuje. Poznate spolne razlike feritinskog kompleksa u bubrezima, koje prate sadržaj željeza, do sada nisu istražene praćenjem podjedinica feritina pojedinačno niti je utvrđen utjecaj spolnih hormona i starenja.

Ovim radom praćen je učinak spola, gonadektomije i starenja na razini raspodjele i prisutnosti FtL i FtH u bubrezima tromjesečnih i dvogodišnjih eksperimentalnih životinja primjenom imunokemijskih metoda. Rezultati ukazuju na spolne razlike u korist ženki za oba lanca feritina nakon spolnog sazrijevanja koje prate nakupljanje željeza, a određene se pozitivnim učinkom estrogena, i u manjoj mjeri negativnim učinkom testosterona. Starenjem se pojačava ekspresija FtL i FtH u oba spola, ali FtL ne raste u potpunosti u skladu s nakupljanjem željeza u bubrezima. Iako zaštićeno u feritinu, ovo željezo bi moglo biti odgovorno za veću osjetljivost bubrega, ali i cijelog organizma na reaktivne vrste kisika u starijoj dobi te nakon bilo kojeg poremećaja. Model spolnih i starosnih razlika u nakupljanju željeza i feritina izvrsna je baza je za proučavanje fiziologije prijelaznih metala i proteina koji ih prate, te mogućih intervencija za zdravije starenje.

## SUMMARY

Although the main storage organ for iron is liver, the kidneys maintain the state of general homeostasis, but also the homeostasis of transition metals by filtration and reabsorption. In rat kidneys, as well as in the liver, the iron content shows sex and age differences in favor of females vs. males, and increases in both with age. Iron is stored in the form of a ferritin complex, the nanocage built of a total of 24 subunits. Light (FtL) and heavy (FtH) subunits form a hollow sphere that can store up to 4500 iron atoms in bioavailable form. Sex and age differences in iron accumulation in the liver and kidneys were determined by the earliest research and subsequently related to the level of ferritin. Known sex differences of the ferritin complex in the kidneys, which reflect iron content, have not been investigated by monitoring ferritin subunits individually so far, nor has the effect of sex hormones and aging been established.

This work studied the effect of sex, gonadectomy, and aging on the distribution and presence of FtL and FtH in the kidneys of three-month and two-year-old experimental animals using immunochemical methods. The results indicate that pronounced sex differences in favor of females for both FtL and FtH that exist in mature animals following iron accumulation, and are determined by the positive effect of estrogen, and to a lesser extent by the negative effect of testosterone. With aging, the presence of FtL and FtH in both sexes increases, but FtL not following the accumulation of iron in the kidneys of males and females. Even protected in ferritin, this iron could be responsible for a higher sensitivity of the kidneys, but also the whole organism to reactive oxygen species and after any kind of insult in old age. The model of sex and age differences in iron and ferritin accumulation is an excellent basis for studying the physiology of transition metals and proteins that accompany them, but also possible interventions for healthier aging.

## **9. POPIS KRATICA**

AKI	akutno bubrežno zatajenje ( <i>engl.</i> acute kidney injury)
Apo –Tf	apotransferin, molekula tranferina bez vezanog željeza
ARE	promotorska regija ARE ( <i>engl.</i> antioxidant response element)
BSA	albumin iz goveđeg seruma ( <i>engl.</i> bovine serum albumin)
CAT	katalaza ( <i>engl.</i> catalase)
DAM-CY3	magareće protutijelo usmjereno protiv mišjeg IgG-a obilježeno obilježeno fluorescirajućom CY3 ( <i>engl.</i> donkey anti-mouse CY3)
DcytB	duodenalna citokrom B reduktaza ( <i>engl.</i> duodenal cytochrome B reductase)
DK	distalni kanalić nefrona
DMT1	prijenosnik divalentnih metala 1 ( <i>engl.</i> divalent metal transporter 1)
FPN1	feroportin ( <i>engl.</i> ferroportin, solute carrier SLC40A1)
FtH	feritin teški lanac ( <i>engl.</i> ferritin heavy chain)
FtL	feritin laki lanac ( <i>engl.</i> ferritin light chain)
GAM-AP	kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno alkalnom fosfatazom ( <i>engl.</i> goat anti mouse alkaline phosphatase)
GIT	gastrointestinalni trakt
GPx	glutation peroksidaza ( <i>engl.</i> glutathione peroxidase)
GSH	glutation; tripeptidni stanični tiol (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicin)
HCP1	receptor za hem ( <i>engl.</i> heme carrier protein 1)
HIF	hipoksijom inducibilni faktor ( <i>engl.</i> hypoxia-inducible factor)
HP	Henleova petlja
iNOS	inducibilna sintaza dušikovog oksida ( <i>engl.</i> inducible nitric oxide synthase)
IRE	element odgovora na željezo ( <i>engl.</i> iron responsive elements)
IRP	protein odgovora na željezo ( <i>engl.</i> iron regulatory proteins)
LIP	labilni skup željeza ( <i>engl.</i> labile iron pool)
mRNA	glasničke RNA ( <i>engl.</i> messenger RNA)
MT	metalotionein
MTF1	transkripcijski faktor reguliran metalima ( <i>engl.</i> metal responsive transcription factor 1)

NCOA4	koaktivator 4 nuklearnog receptora ( <i>engl.</i> nuclear receptor coactivator 4)
NF- $\kappa$ B	transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B ( <i>engl.</i> nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGAL	lipokalin ( <i>engl.</i> neutrophil gelatinase-associated lipocalin)
Nrf2	transkripcijski faktor ( <i>engl.</i> nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
NTBI	ne-transferinski vezano željezo ( <i>engl.</i> non-transferin bound iron)
PCBP	proteini koji isporučuju željezo ( <i>engl.</i> poly(rC)-binding proteins)
PK	proksimalni kanalić nefrona
RME	receptorom posredovana endocitoza ( <i>engl.</i> receptor mediated endocytosis)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi ( <i>engl.</i> reactive oxygen species)
SK	sabirni kanalić nefrona
SOD	superoksid dismutaza ( <i>engl.</i> superoxide dismutase)
STEAP	metaloreduktaza ( <i>engl.</i> six transmembrane epithelial antigen of prostate)
Tf	transferin
TfR1	transferinski receptor
TNF- $\alpha$	proupalni citokin, faktor nekroze tumora, ( <i>engl.</i> tumor necrosis factor $\alpha$ )
UTR	netranslatirana regija mRNA ( <i>engl.</i> untranslated region, UTR)
ZIP 14	transporter cinka, SLC39A14 ( <i>engl.</i> Zrt (zinc-regulated transporters)/ Irt (iron regulated transporter)-like protein 14)
$\beta$ ME	$\beta$ -merkaptioetanol ( <i>engl.</i> $\beta$ -mercaptoethanol)

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/  
BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### **PRAĆENJE OBJE PODJEDINICE FERITINA U BUBREZIMA ŠTAKORA IMUNOKEMIJSKIM METODAMA NOVE GENERACIJE: SPOLNE I STAROSNE RAZLIKE TE UTJECAJ GONADEKTOMIJE**

**Andrea Hlupić**

#### **SAŽETAK**

Iako glavnu skladišnu ulogu željeza u organizmu ima jetra, bubrezi filtracijom i reapsorpcijom održavaju stanje opće homeostaze, ali i homeostaze prijelaznih metala u organizmu. U bubrežima štakora, kao i u jetri, sadržaj željeza pokazuje spolne i starosne razlike u korist ženki naspram mužjaka, a starenjem se povećava. Željezo se pohranjuje u obliku feritinskog kompleksa, odnosno nanokaveza građenog od ukupno 24 podjedinice. Laki (FtL) i teški (FtH) lanci formiraju šuplju sferu koja može pohraniti i do 4500 atoma željeza u bioraspoloživom obliku. Spolne i starosne razlike u nakupljanju željeza u jetri i bubrežima utvrđene su najranijim istraživanjima i naknadno povezane s razinom feritina koji ga pohranjuje. Poznate spolne razlike feritinskog kompleksa u bubrežima, koje prate sadržaj željeza, do sada nisu istražene praćenjem podjedinica feritina pojedinačno niti je utvrđen utjecaj spolnih hormona i starenja. Ovim radom praćen je učinak spola, gonadektomije i starenja na razini raspodjele i prisutnosti FtL i FtH u bubrežima tromjesečnih i dvogodišnjih eksperimentalnih životinja primjenom imunokemijskih metoda. Rezultati ukazuju na spolne razlike u korist ženki za oba lanca feritina nakon spolnog sazrijevanja koje prate nakupljanje željeza, a određene su u manjoj mjeri pozitivnim učinkom estrogena, i negativnim učinkom testosterona. Starenjem se pojačava ekspresija FtL i FtH u oba spola, ali ne u potpunosti u skladu s nakupljanjem željeza u bubrežima. Iako zaštićeno u feritinu, ovo željezo bi moglo biti odgovorno za veću osjetljivost bubrega, ali i cijelog organizma na reaktivne vrste kisika u starijoj dobi te nakon bilo kojeg poremećaja. Model spolnih i starosnih razlika u nakupljanju željeza i feritina izvrsna je baza za proučavanje fiziologije prijelaznih metala i proteina koji ih prate, te mogućih intervencija za zdravije starenje. Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 74 stranice, 21 sliku, 1 tablicu i 61 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: feritin, bubrezi, laki i teški lanac feritina, spolne razlike, starosne razlike, gonadektomija, steroidni hormoni, prijelazni metali, željezo, reaktivne kisikove vrste

Mentor: **Dr. sc. Petra Turčić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Marija Ljubojević**, *viši znanstveni suradnik, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Petra Turčić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marija Ljubojević**, *viši znanstveni suradnik, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Studeni 2020.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### MONITORING OF BOTH FERRITIN SUBUNITS IN RAT KIDNEYS BY NEW - GENERATION IMMUNOCHEMICAL METHODS: SEX AND AGE DIFFERENCES AND THE EFFECTS OF GONADECTOMY

Andrea Hlupić

#### SUMMARY

Although the main storage organ for iron is liver, the kidneys maintain the state of general homeostasis, but also the homeostasis of transition metals by filtration and reabsorption. In rat kidneys, as well as in the liver, the iron content shows sex and age differences in favor of females vs. males, and increases in both with age. Iron is stored in the form of a ferritin complex, the nanocage built of a total of 24 subunits. Light (FtL) and heavy (FtH) subunits form a hollow sphere that can store up to 4500 iron atoms in bioavailable form. Sex and age differences in iron accumulation in the liver and kidneys were determined by the earliest research and subsequently related to the level of ferritin. Known sex differences of the ferritin complex in the kidneys, which reflect iron content, have not been investigated by monitoring ferritin subunits individually so far, nor has the effect of sex hormones and aging been established. This work studied the effect of sex, gonadectomy, and aging on the distribution and presence of FtL and FtH in the kidneys of three-month and two-year-old experimental animals using immunochemical methods. The results indicate that pronounced sex differences in favor of females for both FtL and FtH that exist in mature animals following iron accumulation, and are determined to a lesser extent by the positive effect of estrogen, and by the negative effect of testosterone. With aging, the presence of FtL and FtH in both sexes strongly increases, not following the accumulation of iron in the kidneys of males and females. Even protected in ferritin, this iron could be responsible for a higher sensitivity of the kidneys, but also the whole organism to reactive oxygen species in old age and after any kind of insult in old age. The model of sex and age differences in iron and ferritin accumulation is an excellent basis for studying the physiology of transition metals and proteins that accompany them, but also possible interventions for healthier aging.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 74 pages, 21 figures, 1 table and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ferritin, kidneys, light and heavy ferritin chain, sex difference, age differences, gonadectomy, steroid hormones, transition metals, iron, reactive oxygen species

Mentor: **Petra Turčić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Marija Ljubojević, Ph.D.** Senior scientific associate, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

Reviewers: **Petra Turčić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marija Ljubojević, Ph.D.** Senior scientific associate, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2020.