

# Utvrđivanje spolnih i starosnih razlika u ekspresiji obje podjedinice feritina imunokemijskim metodama nove generacije

---

**Antolić, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:163:588930>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Nikolina Antolić**

**Utvrdjivanje spolnih i starosnih razlika u  
ekspresiji obje podjedinice feritina  
imunokemijskim metodama nove generacije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Petri Turčić i komentorici dr. sc. Mariji Ljubojević na stručnom vodstvu, iskazanom povjerenju, korisnim sugestijama, strpljenju te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ovog rada. Također zahvaljujem tehničkoj suradnici gđi. Ljiljani Babić na izuzetnoj i nesebičnoj pomoći, te podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada te dr. sc. Renati Novak Mirčetić, voditeljici tehničke podrške Gorea Plus d.o.o., na osiguravanju probnog materijala za imunokemijske analize. Hvala i svim ostalim članovima Jedinice za molekulsku toksikologiju na ugodnoj atmosferi i posrednoj ili neposrednoj pomoći u realizaciji ovog rada.

Nadalje, želim se zahvaliti prijateljima i kolegama koji su uvelike doprinijeli mom profesionalnom razvoju, posebice Veroniki, Antoniji, Ani, te svom dečku Franji Josipu na izrazitom strpljenju, ali i ohrabrenju koje su mi pružali kada bih posustala i radovanju svakom mom uspjehu.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojoj najužoj obitelji koji su mi bili najveća podrška tokom ovog fakultetskog obrazovanja. Hvala im na izuzetnoj moralnoj podršci i razumijevanju, hvala što su uvijek bili tu za mene, hvala što su vjerovali te me podržavali u svim mojim nastojanjima. Bez njih ne bi bilo ovog rada, niti bilo kojeg uspjeha. Hvala za sve.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ŽELJEZO NA RAZINI ORGANIZMA</b>	<b>2</b>
1.1.1. Fiziologija i distribucija željeza u tijelu sisavca	2
1.1.2. Željezo na razini tkiva i organa	7
1.1.3. Sistemska regulacija željeza	8
<b>1.2. ŽELJEZO NA RAZINI STANICE</b>	<b>11</b>
1.2.1. Homeostaza željeza u stani	11
<b>1.3. FERITIN</b>	<b>12</b>
1.3.1. Struktura i funkcija feritina	12
1.3.2. Uloga feritina u homeostazi željeza, oksidativni stres i međudjelovanje s drugim proteinskim molekulama	14
<b>1.4. SPOLNE I STAROSNE RAZLIKE U SADRŽAJU ŽELJEZA</b>	<b>15</b>
<b>1.5. SPOLNE RAZLIKE U SADRŽAJU FERITINA</b>	<b>17</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>22</b>
<b>3.1. PUFERI I OTOPINE</b>	<b>23</b>
<b>3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR</b>	<b>24</b>
<b>3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE</b>	<b>25</b>
<b>3.4. PROTUTIJELA</b>	<b>26</b>
3.4.1. Primarna protutijela	26
3.4.2. Sekundarna protutijela	27
<b>3.5. METODE ISTRAŽIVANJA</b>	<b>28</b>
3.5.1. Izolacija homogenata iz jetre i bubrega	28
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina	28
3.5.3. SDS–elektroforeza u gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) i western analiza	29
3.5.4. Densitometrija	32
3.5.5. Fiksiranje tkiva <i>in vivo</i>	32
3.5.6. Tkivni narezci i posredna imunofluorescencija	33
3.5.7. Kuhanje u citratnom puferu pH 6 i obrada neionskim detergentom	34
3.5.8. Prikaz i statistička obrada podataka	34
<b>4. REZULTATI</b>	<b>36</b>
<b>4.1. KARAKTERIZACIJA PROTUTIJELA RAZVIJENIH PROTIV LAKOG I TEŠKOG LANCA FERITINA</b>	<b>37</b>
<b>4.2. RASPODJELA I KOLIČINA LAKOG I TEŠKOG LANCA FERITINA S OBZIROM NA SPOLNE I STAROSNE RAZLIKE U JETRI ŠTAKORA</b>	<b>39</b>
<b>4.3. UTJECAJ GONADEKTOMIJE NA SADRŽAJ LAKOG I TEŠKOG LANCA FERITINA U JETRI ŠTAKORA</b>	<b>46</b>

5.	RASPRAVA	49
6.	ZAKLJUČCI	55
7.	LITERATURA	58
8.	SAŽETAK/SUMMARY	63

POPIS KRATICA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

## **1. UVOD**

O važnosti odabranog područja istraživanja najbolje govori brojnost dosad objavljenih članaka na sličnu temu. Naime, dosad je objavljeno oko 200 000 članaka na temu željeza dok je o feritinu objavljeno samo oko 30 000 članaka ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Proces anabolizma željeza s feritinom te funkcija feritina generalno još je uvijek nedovoljno razjašnjena, a spomenuta saznanja su potrebna za daljnja fiziološka i toksikološka istraživanja.

Feritin je jedan od prvih proteinskih kompleksa koji su izolirani i čija je karakterizacija počela na svim razinama već od 1937. godine (Arosio i Levi, 2002). Ispitivanjima se ustanovio aminokiselinski sastav podjedinica, njihova funkcija u vezanju i oksidaciji željeza, a velik uspjeh bile su i kristalografske strukture kompleksa. Premda ulazi u međudjelovanja s ostalim esencijalnim prijelaznim metalima, skladištenje željeza u stanici se smatra njegovom primarnom ulogom. Danas se feritinski kompleks aktualno istražuje i u nanotehnologiji ciljane dostave lijekova.

Već 50-tih godina prošlog stoljeća ustanovljene su spolne razlike u pohrani željeza u jetri kod eksperimentalnih životinja glodavaca (Widdowson i McCance, 1947, 1952), znalo se za utjecaj spolnih hormona na pohranu željeza no ne i za ulogu feritina. Tek dvadesetak godina kasnije dvije grupe (Bjørklid i Helgeland, 1970; Linder i sur., 1973) nalaze da razlike u sadržaju željeza jasno koreliraju sa spolnim razlikama u ekspresiji obje podjedinice feritina u mužjacima, odnosno ženkama. Nakupljanje željeza u jetri je u korist ženki vjerojatno zbog potrebe u generativnoj funkciji koja prati anabolizam brzog rasta fetusa (Kong i sur., 2014). Poznato je da postoje spolne i starosne razlike u sadržaju željeza, te spolne razlike u sadržaju feritina, dok starosne razlike nisu jasno utvrđene, pogotovo novijim imunokemijskim metodama praćenja obje podjedinice feritina. Moguće posljedice manjka feritina rezultirale bi potencijalno većom količinom slobodnog željeza koje je odgovorno za nastanak reaktivnih kisikovih vrsta te potom i oksidativnog stresa koji je u pozadini procesa starenja, ali i mnogih bolesti. Razjašnjenje ove tematike otvara prostor intervencijama za dulji i zdraviji život.

## 1.1. ŽELJEZO NA RAZINI ORGANIZMA

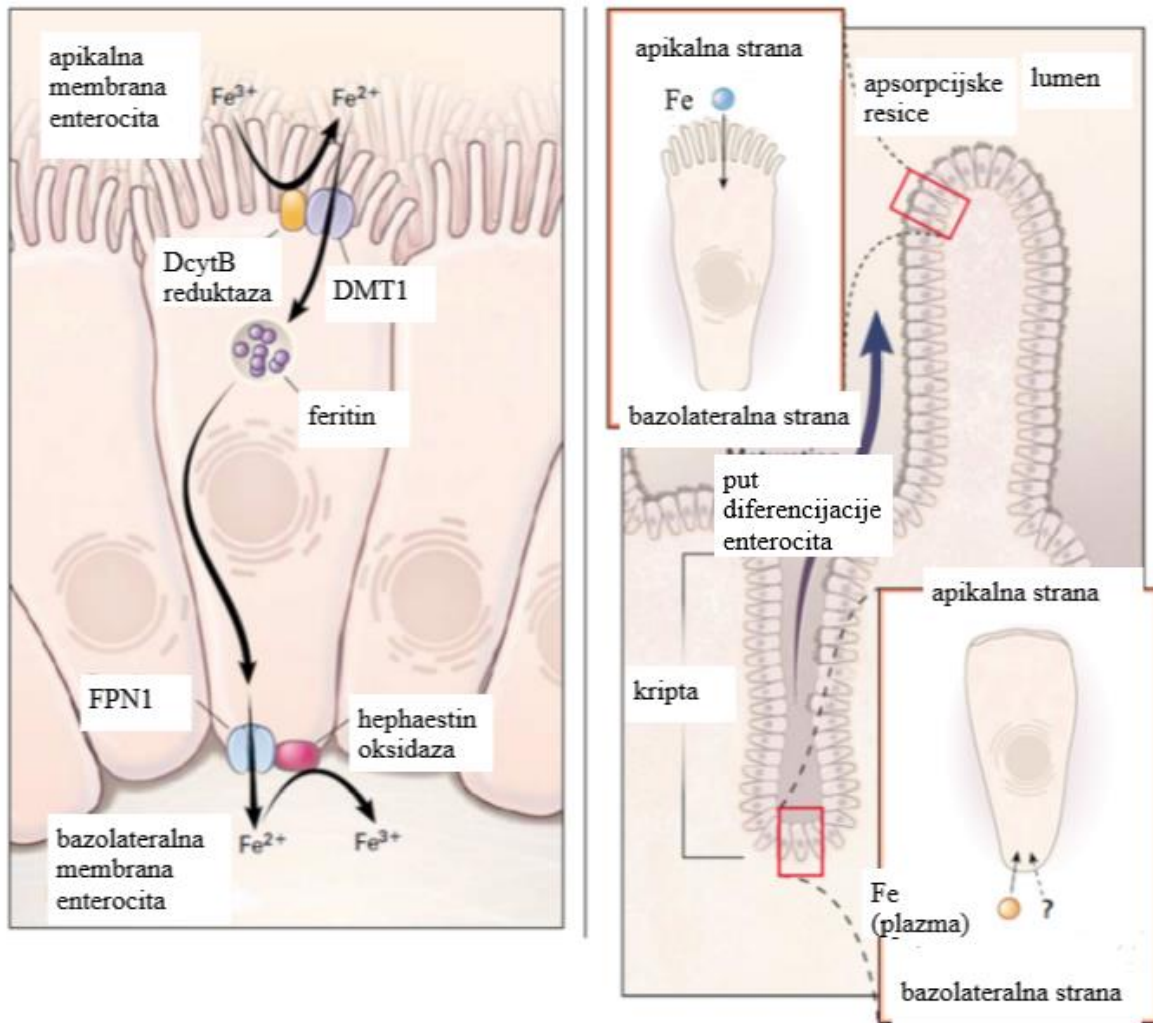
### 1.1.1. Fiziologija i distribucija željeza u tijelu sisavca

Željezo je najzastupljeniji esencijalni prijelazni metal u sisavcima, a prate ga za jedan do dva reda veličine manje količine cinka te zatim i bakra. Iako se često napominje da se većina željeza koristi za prijenos kisika u eritrocitima putem hemoglobina te skladištenje u kisika u mioglobinu mišića, nemale količine se pohranjuju u jetri, srcu, bubrezima, slezeni i drugim organima. Premda je esencijalni element u tragovima mora se vrlo precizno kontrolirati kako oslobođeno ne bi izazvalo nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (*engl.* reactive oxygen species, ROS). Pri nedostatku željeza dolazi do anemija čemu može biti mnoštvo uzroka, no i u suvišku je izrazito opasno po zdravlje, primjerice nakupljanje željeza u jednom od tipova nasljednih hemokromatoza predstavlja čest zdravstveni problem.

Nakon rođenja izuzev egzogenih terapijskih izvora, željezo ulazi u organizam isključivo putem hrane pri čemu razlikujemo hemske i nehemske željezo. Nizak pH želuca i proksimalnog dijela tankog crijeva održava nehemske željezo u topljivoj formi raspoloživoj za apsorpciju te se ono prenosi kroz apikalnu membranu u citosol enterocita pomoću prijenosnika divalentnih metala DMT1 (*engl.* divalent metal transporter 1), a kroz bazolateralnu membranu u cirkulaciju pomoću transportera feroportina 1 (FPN1) (Slika 1.). O molekularnim pojedinostima apsorpcije henskog željeza zasada se jako malo zna, međutim pretpostavlja se da se veže za receptore klase CD (CD91 i 163) (*engl.* cluster of differentiation) na četkastoj membrani enterocita te potom ulazi u stanicu procesom endocitoze (Anderson i Frazer, 2017).

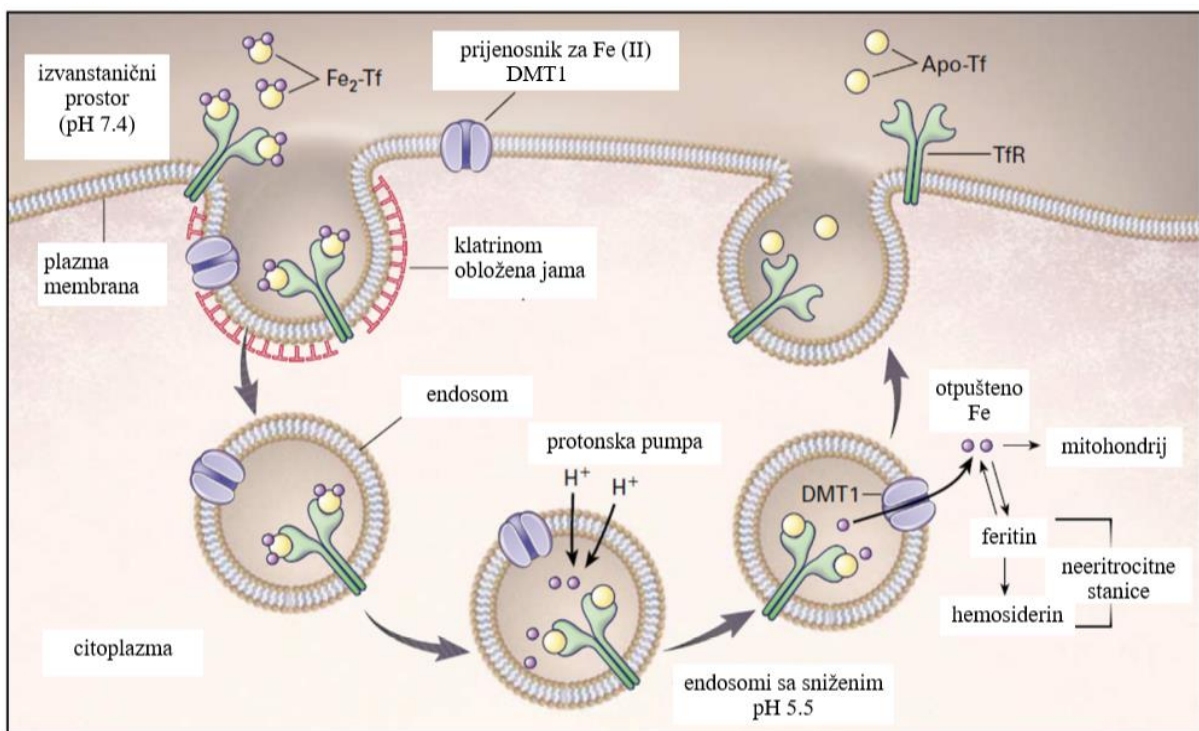
U apsorpciji u gastrointestinalnom traktu (GI) glavnu ulogu imaju DMT1 prijenosnici za Fe (II) na apikalnoj membrani enterocita GI koji zajedno s reduktazom DcytB koja reducira Fe (III) unesen hranom u Fe (II) omogućuju unos željeza iz hrane u organizam. Nadalje, ako uneseno željezo nije odmah potrebno organizmu ono se pohranjuje unutar enterocitne stanice GI uz pomoć nanokaveza feritina, međutim ukoliko je potrebno organizmu prenosi se kroz bazolateralnu membranu enterocita putem FPN1 uz paralelnu oksidaciju hephaestin oksidazom u Fe(III) kojeg zatim preuzima transferin.





**Slika 1. Transport željeza kroz crijevni epitel (lijevo) i regulacija intestinalne apsorpcije željeza (desno).** Željezo mora proći dvije membrane, apikalnu i bazolateralnu membranu enterocita, kako bi se apsorbiralo kroz crijevni epitel i ušlo u krvotok. Svaki transmembranski prijenosnik je spojen sa enzimom koji mijenja oksidacijski status željeza. Prijenosnik na apikalnoj membrani je poznat kao DMT1 koji radi usklađeno sa enzimom iz porodice ferireduktaza. Prijenosnik na bazolateralnoj membrani nedavno je identificiran FPN1 koji zahtjeva aktivnost hephaestin oksidaze, enzima tipa ferooksidaze, kako bi omogućio ulazak željeza u plazmu. Nadalje, intestinalna apsorpcija željeza regulirana je s najmanje 3 neovisna mehanizma te se odvija preko zrelih enterocita na središnjem dijelu apsorpcijske resice u tankom crijevu. Prvi, ovisna je o nedavnom unosu željeza hranom. Ukoliko je već unesena dovoljna količina željeza, stanice intestinalnog sustava postaju rezistentne na dodatan unos željeza u trajanju od nekoliko dana. Drugi, apsorpcija željeza može biti znatno regulirana odgovorom tijelu na omjer pohranjenog i potrebnog željeza. Treći, potreba eritropoeze. Povećanjem proizvodnje crvenih krvnih stanica u koštanoj srži, usporedno raste i obujam intestinalne apsorpcije željeza (Andrews, 1999).

Dva atoma Fe(III) vezana za transferin, sistemski su na raspolaganju svakoj stanici organizma koje eksprimiraju transferinski receptor (*engl.* transferrin receptor, TFR) na plazma membrani. Transferin sa željezom veže se na transferinski receptor procesom receptor posredovane endocitoze (*engl.* receptor mediated endocytosis, RME) i biva uvučen u stanicu formiranjem standardne klatrinske endocitozne vezikule. Daljnji proces razdvajanja klatrina i fuzije vezikula dovodi do toga da kompleks transferina, receptora i željeza završi u ranim i kasnim endosomima sa sniženim pH koji pomaže da se željezo oslobodi od transferina i receptora. Transferin i receptor se vraćaju na plazma membranu i zatim mogu u daljnji ciklus prikupljanja željeza, dok se željezo načelno ponovno reducira STEAP3 reduktazom i uz pomoć DMT1 transportera izlazi iz endosoma da bi se moglo koristiti u anabolizmu stanice ili pohraniti u feritinskom nanokavezu (Slika 2.) (Arosio, 2017).

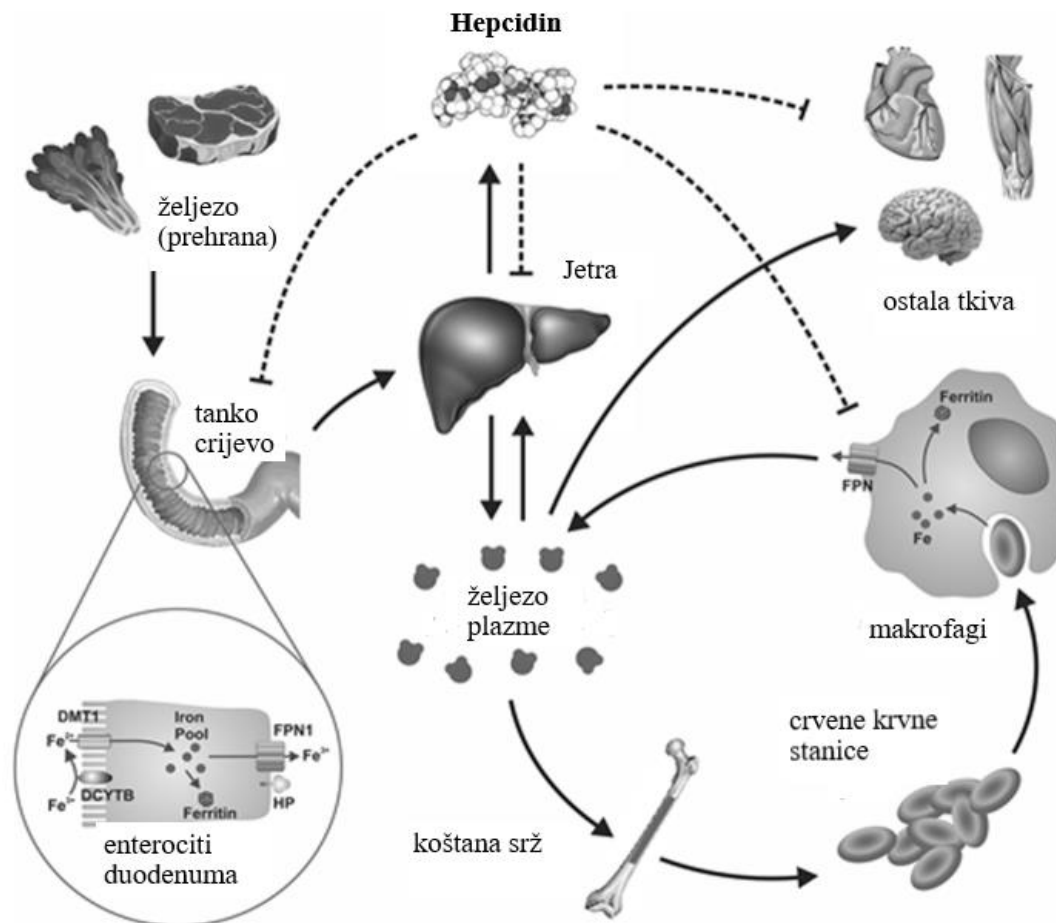


**Slika 2. Ciklus transferina.** Transferin sa vezanim željezom (Fe<sub>2</sub>-Tf) sjeda na transferinski receptor (TfR) na plazma membrani stanice. Invaginacijom nastalog kompleksa u klatrinom obloženoj vezikuli nastaju specijalizirani endosomi. Protonske pumpe snizuju pH unutar endosoma uzrokujući konformacijske promjene proteina što rezultira otpuštanjem željeza od kompleksa transferina i receptora. Transporter željeza DMT1 prebacuje željezo iz endosoma u citosol stanice. Transferin (Apo-Tf) i transferinski receptor se vraćaju na površinu stanice te idu u daljnji ciklus prikupljanja željeza. U nezrelim eritrocitima većina željeza ide u

mitohondrije gdje se ugrađuje u protoporfirin čineći hem, dok se u neeritocitnim stanicama željezo pohranjuje u nanokavezu feritina i ponekad u (pato)fiziologiji kao precipitat hemosiderin (Andrews, 1999).

Željezo apsorbirano u gastrointestinalnom traktu (GI), ali i željezo otpušteno iz skladišnih depoa feritina, prijenosom krvotokom uz pomoć transferina dolaze do svih stanica vežući se na sveprisutan transferinski receptor (TfR) na plazma membranama stanica. Vidi ciklus transferina na slici 2. Unutar normalnih okolnosti zasićenost veznih mjesta transferina željezom iznosi 30 %. Tako vezano željezo se raspodjeljuje po čitavom tijelu. Specijalne stanice koje željezo koriste u većim količinama kao primjerice, hematopoetske stanice koštane srži imaju prilagođenu molekularnu fiziologiju tim procesima kao i stanice jetre, hepatociti koje višak željeza uskladištavaju.

U normalnoj regulaciji ponude željeza hranom i potražnje metabolizma željeza homeostaza funkcionira i sve sastavnice su u ravnoteži, a pozitivne i negativne povratne sprege održavaju kontrolu tzv. slobodnog željeza u uskom rasponu s malim varijacijama. Tako primjerice, obrada eksperimentalnih životinja povećanim unosom željeza hranom ima učinak na uskladišteno željezo dok željezo i hemoglobin u krvi ostaju gotovo nepromijenjeni. Ključnu ulogu u sistemskoj regulaciji unosa željeza i njegove distribucije u organizmu ima hormon kojeg izlučuje jetra, hepcidin. Glavna meta njegovog djelovanja je ferroportin FPN1 na plazma membranama enterocita, makrofaga, hepatocita i drugih stanica. Djeluje tako da potiče njegovu internalizaciju i degradaciju. Kada je potreba organizma za željezom velika, koncentracije hepcidina su niske čime se omogućuje nesmetana apsorpcija te otpuštanje željeza sa feritina, u svrhu povećanja ukupne razine željeza u plazmi. Suprotno se događa pri visokim koncentracijama hepcidina do kojih dolazi uslijed dovoljne razine željeza u plazmi. Međutim, više riječi o njemu bit će nešto kasnije. U proteine koji su neophodni za održavanje homeostaze željeza u organizmu, osim već spomenutog hepcidina, ubrajamo i transferin koji je ključan za distribuciju željeza do svih potrebitih stanica organizma te feritin koji može pohraniti enormne količine željeza, a također služi kao uvijek dostupan endogeni izvor stanici dostupnog, bioraspoloživog željeza (Anderson i Frazer, 2017).



**Slika 3. Homeostaza željeza na razini organizma.** Željezo iz egzogenih izvora apsorbira se putem enterocita u tankom crijevu, te se potom veže za protein plazme transferin pomoću kojeg se raspodjeljuje po čitavom tijelu. Osobito veliku količinu željeza koriste nezrele crvene krvne stanice u koštanoj srži u svrhu proizvodnje hemoglobina. Stari eritrociti bivaju fagocitirani od strane makrofaga pri čemu katabolizmom hemoglobina dolazi do otpuštanja željeza koje ponovno ulazi u cirkulaciju. Hormon jetre hepcidin je ključan u sistemskejoj regulaciji ukupne razine željeza u plazmi s obzirom na potrebe organizma (Anderson i Frazer, 2017).

Regulacija intestinalne apsorpcije je ključna jer u ljudi nedostaje fiziološki put izlučivanja željeza. U normalnim uvjetima se svaki dan iz tijela izluči samo 1-2 mg željeza. Više od dvije trećine željeza organizma je ugrađeno u hemoglobin crvenih krvnih stanica, dok preostalih 10-15 % je prisutno u mišićima u obliku mioglobina te ostalim tkivima kao sastavni dio mnogih enzima i citokroma (Muckenthaler i sur., 2017).

### 1.1.2. Željezo na razini tkiva i organa

Različiti organi imaju različite zahtjeve kada je željezo u pitanju. Čak i unutar pojedinih tkiva, različiti tipovi stanica mogu se razlikovati u sposobnosti korištenja varijanti željeza kao i u kapacitetu skladištenja istoga (Anderson i Frazer, 2017). Koštana srž ima veće potrebe željeza od bilo kojeg drugog tkiva jer se enormne količine željeza troše na sintezu hemoglobina za nove crvene krvne stanice. Tkiva sa visokim proliferacijskim kapacitetom generalno koriste veće količine željeza od drugih tkiva, pa tako nezrele crvene krvne stanice imaju izrazito visoku ekspresiju transferinskih receptora na plazma membranama. U slučajevima ograničene opskrbe željezom, raspodjela po tkivima slijedi prioritete. Primjerice, u trudnoći je dana prednost opskrbi fetusa željezom u odnosu na majku.

Slezena nalikuje na limfne čvorove, samo što kroz njezine tkivne prostore umjesto limfe protječe krv. Poseban način prolaska krvi kroz tračke crvene pulpe omogućuje djelotvornu fagocitozu starih i nenormalnih eritrocita. Fagocitozu vrše makrofagi koji se nalaze u mreži retikularnih stanica, a ona za posljedicu ima razgradnju hemoglobina te otpuštanje željeza u cirkulaciju na raspolaganje drugim stanicama i tkivima. Dakle, omogućuje ponovnu upotrebu već korištenog željeza.

Jetra i bubrezi izuzetno su bitni za fiziologiju metabolizma željeza ne samo zato jer jetra ima glavnu ulogu u skladištenju željeza, a bubrezi sudjeluju u njegovoj reciklaži već i u sistemskoj regulaciji putem hormona jetre hepcidina zbog kojeg se željezo uskladištava te hormona bubrega eritropoetina koji mobilizira željezo za hematopoezu. Detalje sistemske regulacije navedenim hormonima vidi u poglavlju 1.1.3.

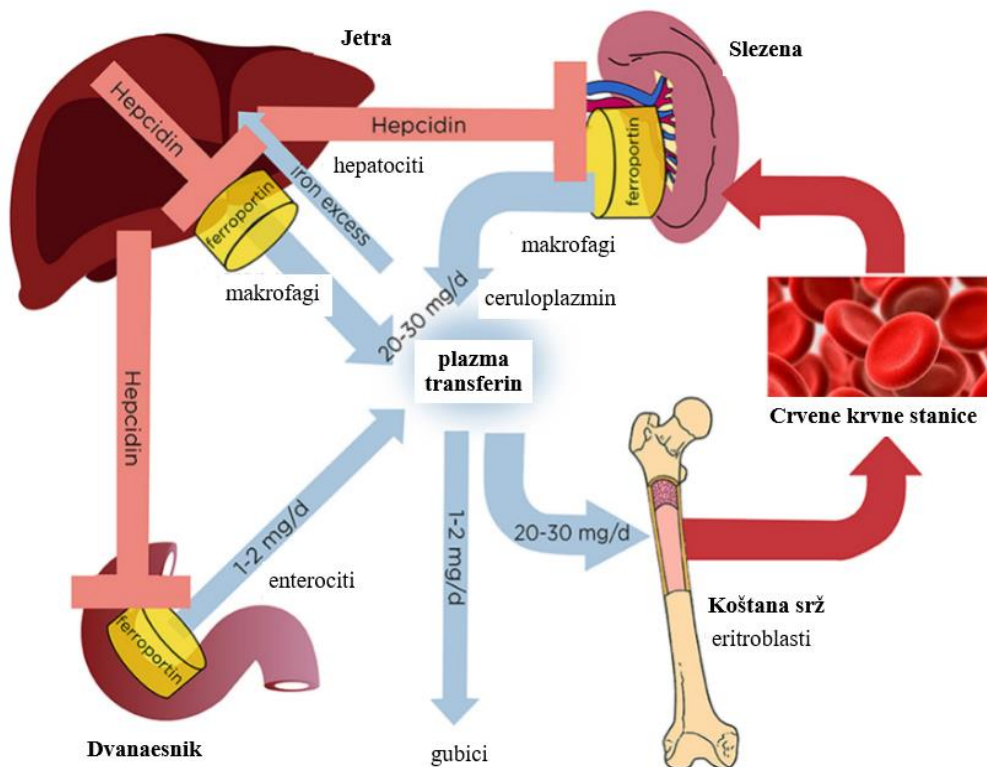
Jetra ima glavnu ulogu u skladištenju željeza u organizmu sisavaca bilo eksperimentalnih životinja bilo čovjeka, kao što smo već spomenuli. Željezo koje se pohranjuje može biti produkt katabolizma (razgradnje starih eritrocita) ili zaliha za daljnje anaboličke procese u koje spada eritropoeza odnosno formiranje hemoglobina, te izgradnja strukturnih željezo-sumpor kompleksa kao i katalitičkih jezgri za redoks aktivne enzime (Pantopoulos i sur., 2012).

### **1.1.3. Sistemska regulacija željeza**

#### **1.1.3.1. Sistemska regulacija željeza hormonom jetre hepcidinom**

Hepcidin je mali peptidni hormon koji svojim prisustvom kontrolira feroportin FPN1 na membrani stanica enterocita i hepatocita te ako ga ima više željezo se zatvara u feritinske nanokaveze i pohranjuje, a ako ga ima manje željezo se otpušta u sistemske cirkulaciju iz GI i jetre za potrebe organizma. Prethodno spomenuta kontrola feroportina kao mehanizam djelovanja temelji se na vezanju hepcidina na feroportin na površini stanica što završava internalizacijom i lizosomalnom degradacijom ciljnog prijenosnika, čime stanice gube sposobnost otpuštanja željeza u plazmu stoga se ono nakuplja u enterocitima, makrofagima i hepatocitima (Meynard i sur., 2014). Naime, hepcidin sprječava otpuštanje željeza u plazmu iz 3 glavna izvora željeza: apsorpcije željeza iz hrane u tankom crijevu, recikliranja putem makrofaga te otpuštanja pohranjenog željeza iz hepatocita. Osim toga, u povratnoj sprezi višak željeza pospješuje ekspresiju hepcidina (Muckenthaler i sur., 2017). Nadalje, hepcidin kao centralni regulator uskladištenog željeza u jetri također je pod regulacijom spolnih hormona i potencijalno uzrokuje spolne razlike pohranjenog željeza o čemu će više riječi biti u poglavlju 1.5.

Razina cirkulirajućeg hepcidina je regulirana željezom, stoga kod visokog sadržaja željeza u plazmi dolazi do otpuštanja veće količine hepcidina iz hepatocita što rezultira ograničenjem intestinalne apsorpcije željeza, ali i njegovog otpuštanja iz zaliha organizma. Suprotno se događa kod nedostatka željeza kada hepatociti otpuštaju manje ili uopće ne otpuštaju hepcidin (Ganz i Nemeth, 2012).



**Slika 4. Hepcidin ima središnju ulogu u održavanju homeostaze željeza.** Hormon jetre hepcidin regulira koncentraciju željeza u plazmi putem sadržaja ferroportina na stanicama koje mogu otpuštati željezo u plazmu, uključujući enterocite, makrofage slezene i jetre te hepatocite (Pantopoulos, 2018).

Prekomjerna ekspresija hepcidina uzrokovana genetskim mutacijama dovodi do posebnog oblika retencijske anemije, odnosno nakupljanja željeza u pojedinim organima te spada u skupinu nasljednih hemokromatoza. Nakupljanje željeza u jetri, srcu, endokrinim žlijezdama i bubrezima povećava oksidativni stres u pojedinim organima što dovodi do njihove disfunkcije, bolesti, zatajenja i povećanog rizika od prerane smrti. Prvi tip nasljednih hemokromatoza (*engl.* hereditary hemochromatosis type 1) ima najčešće SNP (*engl.* single nucleotide polymorphism) mutaciju C282Y HFE gena te se javlja u populaciji zemalja sjevera Europe. U patološkoj slici navodi se povišeni feritin u serumu i saturacija transferina veća od 45 %.

### **1.1.3.2. Sistemska regulacija željeza hormonom bubrega eritropoetinom**

Eritropoetin je hormon intersticija bubrega koji signalizira oksigenaciju u organizmu i potrebu za hematopoezom i željezom. Tijekom aktivne eritropoeze produkcija hepcidina mora biti smanjena kako bi više željeza bilo dostupno za sintezu hemoglobina. Bitnu ulogu u navedenom fiziološkom procesu ima eritropoetin koji negativno regulira hepcidin.

Peritubularni fibroblasti bubrega u odgovoru na hipoksiju otpuštaju eritropoetin koji potiče proliferaciju i terminalnu diferencijaciju crvenih krvnih stanica. Nedavno je identificiran eritroidni regulator hepcidina eritroferon (ERFE) kojeg izlučuju eritroblasti na poticaj eritropoetina. (Muckenthaler i sur., 2016). Njegova zadaća je održavanje supresije hepcidina za vrijeme povećane eritropoeze. Mehanizam se temelji na inhibiciji ekspresije hepcidina što omogućava otpuštanje željeza iz pričuva feritina te povećanje intestinalne apsorpcije željeza u svrhu postizanja dovoljne količine željeza u plazmi za potrebe eritropoeze jer proizvodnja crvenih krvnih stanica izravno ovisi o biodostupnosti željeza.



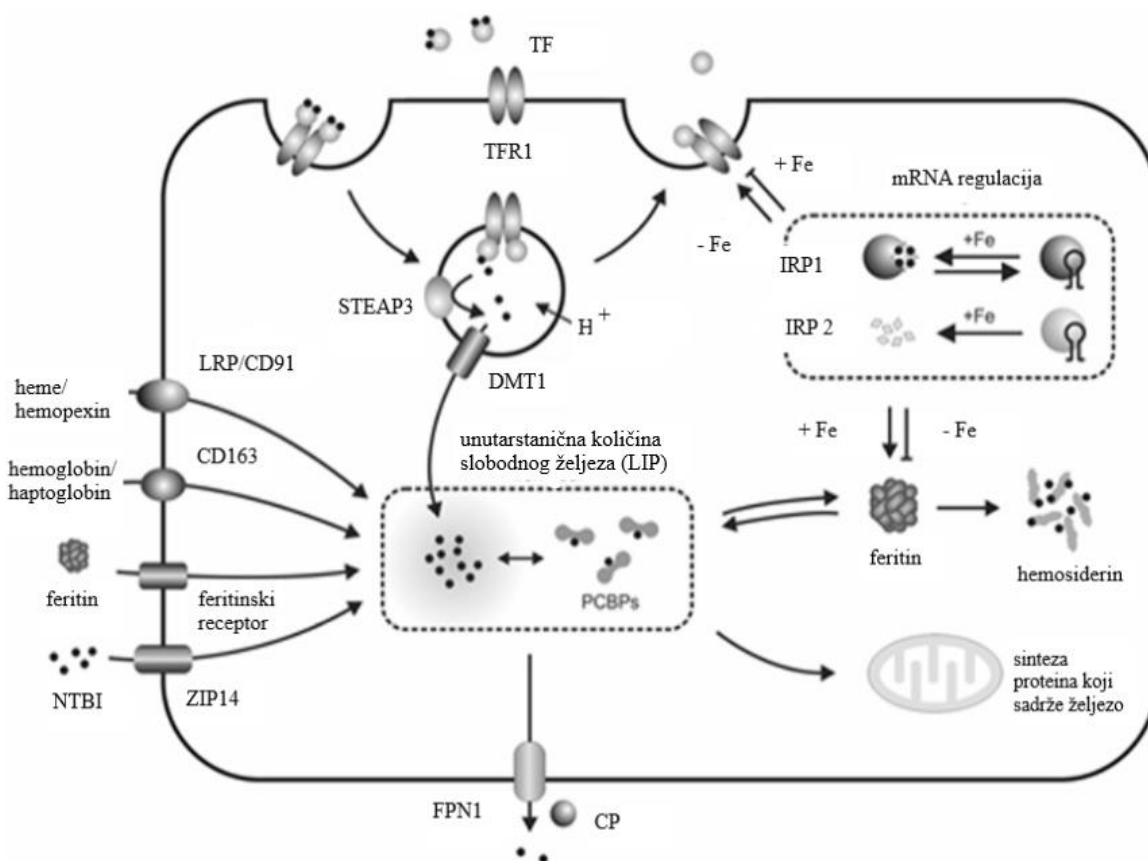
## 1.2. ŽELJEZO NA RAZINI STANICE

### 1.2.1. Homeostaza željeza u stanici

Stanice mogu uzimati željezo u različitim oblicima, ali samo stanice s jezgrom mogu koristiti željezo vezano na transferin. Transferin se veže za transferinske receptore na površini stanice i kompleks se internalizira stvarajući endosome. Zakiseljavanje nastalih endosoma i redukcija željeza pomoću STEAP3 reduktaze omogućuje oslobađanje željeza od transferina, a zatim slobodno željezo prelazi u citosol stanice putem DMT1 prijenosnika. Citosol svake stanice mora sadržavati kinetički labilan i metabolički dostupan depo željeza poznat kao labilni skup željeza (*engl.* labile iron pool, LIP) (Hider i Kong, 2013). Dio željeza se veže na PCBP (*engl.* poly-r(C)-binding proteins) proteine koji isporučuju željezo novosintetiziranim proteinima kojima je potreban za funkciju ili feritinu za pohranu. Kada su zadovoljene stanične potrebe za željezom, ono se može prenjeti izvan stanice putem FPN1 uz paralelnu oksidaciju vezanom oksidazom, npr. ceruloplazmin. Stanični unos željeza i skladištenje regulirani su elementom odgovora na željezo (*engl.* iron-responsive elements, IRE) i IRP (*engl.* iron-responsive proteins) sustavom na razini translacije odnosno regulacije prepisivanja glasičke RNA (messenger, mRNA) tako da niska koncentracija željeza pogoduje sintezi više TFR1 i potiskuje ekspresiju feritina, dok visoki stanični nivo željeza dovodi do povećanja koncentracije feritina i smanjenja TFR1 (Slika 5.).

Dakle, unutarstanični sadržaj željeza reguliran je IRP1 i IRP2 proteinima koji se vežu na određene IRE netranslantirane regije (*engl.* untranslated regions, UTR) mRNA koje kodiraju za feritin, odnosno transferin. Vežanje IRP-a na 5' UTR feritinske mRNA blokira njenu translaciju, čime se osigurava proizvodnja male količine feritina kada skladištenje željeza nije potrebno. Istovremeno, IRP se vežu na 3' UTR mRNA koja kodira za transferinski receptor, čime se štiti poruka od degradacije i omogućava da se eksprimira više TFR1 na staničnoj membrani. Ovaj učinak maksimalizira unos željeza u stanicu. Kada su koncentracije staničnog željeza visoke, IRP-ovi se ne vežu na IRE, čime se omogućuje translacija mRNA feritina i izlaganje mRNA transferinskog receptora degradaciji. Navedeni mehanizmi sprječavaju daljnji unos željeza te potiču njegovu pohranu (Anderson i Frazer, 2017).

Nadalje, neke vrste stanica mogu koristiti i druge oblike željeza osim transferinskog primjerice, željezo iz feritina ili hemoglobina.



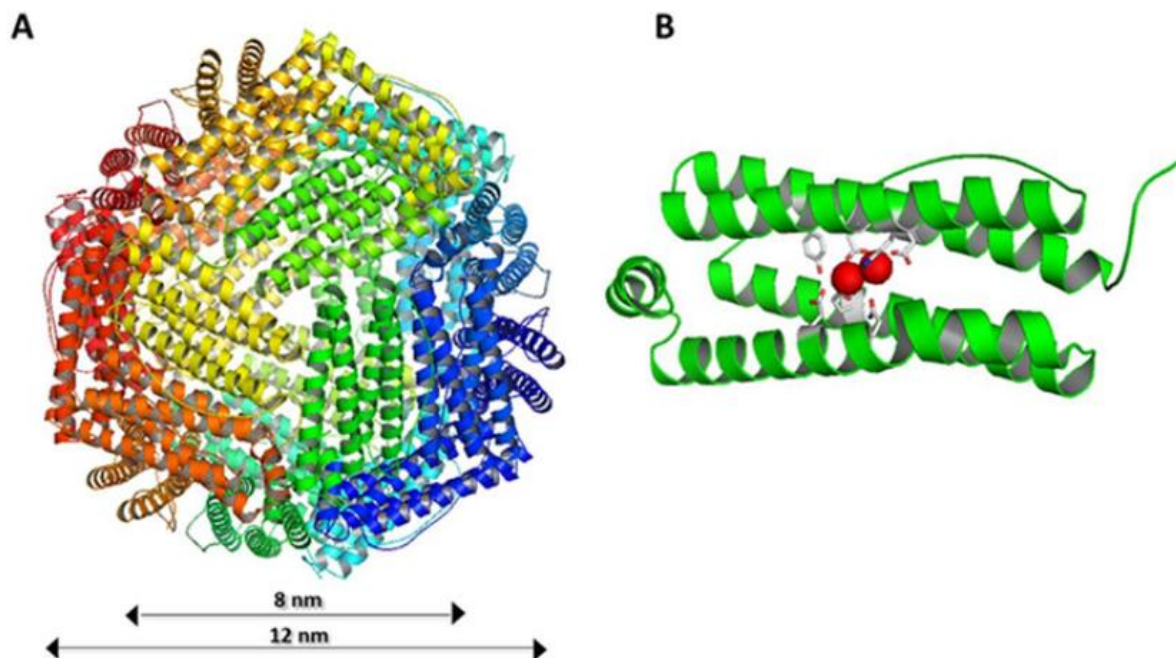
**Slika 5. Unutarstanična homeostaza željeza.** Regulirana je na način da se maksimalizira opskrba kod staničnog nedostatka željeza i ograniči opskrbu te promiče pohranu kada je stanica zasićena željezom. Regulacija postoji na različitim razinama, ali zasada je najviše poznato djelovanje regulatornih proteina željeza IRP1 i IRP2 (Anderson i Frazer, 2017).

### 1.3. FERITIN

#### 1.3.1. Struktura i funkcija feritina

Kompleks feritina u svim stanicama uglavnom služi za skladištenje željeza (III) kao fosfohidrata. Time feritinski kompleks osigurava u stanicama prisustvo željeza u slučaju potrebe, a sprječava toksičnost koju slobodno željezo može uzrokovati.

Feritinski kompleks od 24 podjedinice u obliku nanokaveza, odnosno proteinske kugle, i proteini koji su s njim u međudjelovanju od iznimne su važnosti u svim fiziološkim procesima stanice koji koriste željezo. Laki i teški lanac feritina molekulskih masa oko 20 kDa imaju zasebne uloge u vezanju i oksidaciji željeza. Tako teški lanac feritina katalizira prvi korak u pohrani željeza, oksidaciju Fe (II) u Fe (III), dok laki lanac feritina sadrži vezujuća mjesta za Fe (III) željezo u obliku fosfohidrata (Andrews, 2010). Premda feritinski kompleks ulazi i u međudjelovanja sa ostalim prijelaznim metalima kao esencijalnim cinkom i bakrom, te toksičnim kadmijem, skladištenje željeza u stanici smatra se njegovom primarnom ulogom.



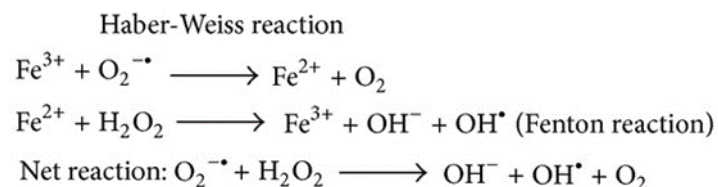
**Slika 6.** Crtež strukture feritina. Prikaz pojedinačnih dimera humanog lanca feritina (B) i proteina sastavljenog od svih 24 podjedinica gledajući odozgo (A) kako bi se prikazao hidrofилni kanal odgovoran za izmjenu željeza (Arosio i sur., 2015).

Već smo spomenuli kako je u sisavcima feritinski kompleks tzv. nanokavez, građen od 24 podjedinice dva proteinska lanca, lakog (LLF, 183 aminokiselina) i teškog (TLF, 182 aminokiselina) koji formiraju kuglu sa šupljinom u koju stane 4500 atoma Fe(III). Dimenzije vanjskog promjera nanokaveza su 12 nm, a unutarnjeg 8 nm (Slika 6.). Laki lanac sudjeluje u strukturi kugle, dok teški ima još i oksidacijsku (feroksidaznu) aktivnost pri čemu prevodi Fe (II) u manje reaktivno Fe (III). Naime, željezo Fe (II) vrlo lako donira elektrone okolnim

molekulama. Navedena osobina je neophodna za prijenos i metabolizam kisika, no može biti izuzetno nepovoljna i odvesti do nastanka slobodnih kisikovih vrsta kad nije regulirana.

### 1.3.2. Uloga feritina u homeostazi željeza, oksidativni stres i međudjelovanje s drugim proteinskim molekulama

Slobodno Fe (II) uz hidrogen peroksid Fenton reakcijom katalizira stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, odnosno slobodnih radikala (ROS). Ciklus nastanka ROS može imati progresiju ako su prisutni superoksid radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) (npr. iz mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona) koji reduciraju Fe (III) u Fe (II) i molekularni kisik Haber-Weiss-ovom reakcijom, čime je Fe (II) ponovno spreman za Fenton reakciju sa  $H_2O_2$  kojoj su produkti hidroksidni ion ( $OH^-$ ) i hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) (Slika 7.). Za navedene reakcije stanica ima evolucijsko rješenje u obliku brzih enzima koji svojim djelovanjem bilo da ne dopuštaju prisutnost superoksid radikala, kao porodica superoksid dismutaza (SOD), bilo da razgrađuju peroksid kao katalaza (CA) ili reduciraju hidroksil radikale kao glutation peroksidaze (GPX) uz pomoć sveprisutnog malog tripeptida glutationa (GSH) i glutation reduktaza, enzima koji regeneriraju antioksidacijska svojstva GSH. Dakle, iako se u stanici govori o određenoj količini slobodnog željeza (*engl.* liable iron pool, LIP) to željezo je vjerojatno u prijenosu s jednog proteina na drugi pri čemu može doći do oslobađanja i time do neminovne štete u obliku povećanja ROS molekula.



**Slika 7.** Prikaz Haber-Weiss i Fenton reakcije nastanka slobodnih hidroksil radikala uz katalitičku aktivnost željeza.

Antioksidativno djelovanje feritinskog kompleksa očituje se u regulaciji ekspresije gena feritinskih podjedinica koje u svojoj promotorskoj regiji imaju ARE (*engl.* antioxidative response element) i reagiraju na oksidativni stres aktivacijom Nrf2 transkripcijskog faktora

(*engl.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Navedenu promotorsku regiju među ostalima, dijeli i sa dvije stresom inducibilne forme metalotioneina, kao i još nekim proteinima zaduženim za metabolizam prijelaznih metala i obranu od oksidativnog stresa. Utvrđivanje međupovezanosti feritinskog kompleksa sa metalotioneinima u metabolizmu željeza, cinka i bakra širi je motiv za istraživanja kojima se želi ustanoviti ponašanje navedenih proteina te njihova uloga u spolnim razlikama koje pojedini prijelazni metali pokazuju, kao i uloga u starenju i mogućnost intervencije za zdraviji i dulji život. Iako to nisu jedine dodirne točke metabolizma feritina i metalotioneina, njihovo međudjelovanje je u pozadini interesa ovog istraživanja te prelazi okvire ovog rada.

Oštećenja svih bioloških molekula koja nastaju povećanjem razine ROS doprinose starenju stanice, razvoju bolesti i u pozadini su gotovo svih oboljenja organizma. Mitohondrijsko lizosomalna os u kojoj željezo kroz aktivnost u razgradno-reciklažnim procesima u stanici može dovesti do pojačanog oksidativnog stresa, već je dugo aktualna među mnogim teorijama uzroka starenja (Kurz i sur., 2007; Terman i Kurz, 2013).

#### **1.4. SPOLNE I STAROSNE RAZLIKE U SADRŽAJU ŽELJEZA**

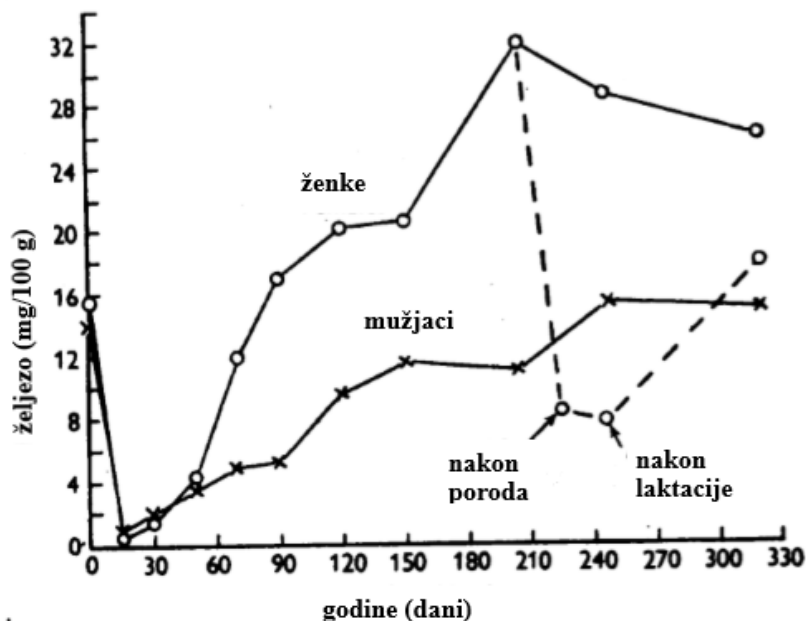
Vrlo ranim istraživanjima 40-tih godina prošlog stoljeća na eksperimentalnim životinjama utvrđene su spolne razlike u količini željeza u jetri i bubrezima u korist ženki (Widdowson i McCance, 1947, 1952). Pri tomu kako je navedeno, jetra ima glavnu ulogu u skladištenju željeza u organizmu dok bubrezi sudjeluju u njegovoj reciklaži. Nadalje, pohranjeno željezo u jetri mužjaka je otprilike dva do tri puta manje nego u ženki. Naizgled jasna fiziološka opravdanost većih zaliha željeza u ženki zbog pripreme tijela za trudnoću u kojoj plod zahtjeva u vrlo kratkom vremenu veliku količinu željeza za rast i razvoj, nije dugo zauzela čvrstu poziciju u fiziologiji spolnih razlika (Kong i sur., 2014). Trenutno prevladava mišljenje da se spolne razlike u nakupljanju željeza u jetri, zasnivaju na utjecaju spolnih hormona na ekspresiju jetrenog hormona hepcidina, sistemskog regulatora željeza. Heparin kontrolom prisustva transmembranskog prijenosnika feroportina te time i mogućnosti izlaza željeza iz hepatocita i enterocita, regulira nakupljanje željeza u stanicama jetre i gastrointestinalnog trakta. Naime, kako je već rečeno, hepcidin se veže za feroportin i signalizira njegovu razgradnju u stanici te tako sprječava izlazak željeza iz stanice. Uz mnoštvo ostalih čimbenika, posebno željeza u suvišku, estrogen stimulira ekspresiju

hepcidina dok testosteron i manjak željeza inhibiraju njegovu ekspresiju. Dakle, prethodno pomno opisan utjecaj spolnih hormona na nakupljanje željeza dokazan je pokusima gonadektomije na mužjacima i ženka štakora (Tablica 1.) (Ljubojević i sur., 2019). Jasno je uočljiv porast sadržaja željeza u kastriranih mužjaka u odnosu na kontrolu zbog pada sadržaja testosterona i njegovog inhibicijskog učinka, te pad sadržaja željeza u ovarijektomiziranih ženki zbog manjka stimulacijskog učinka estrogena.

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

Parameter	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 **

Nadalje, neposredno nakon poroda pada razina estrogena koji stimulira ekspresiju hepcidina i akumulaciju željeza stoga je očekivan i nagli pad razine željeza u tijelu ženki zbog naglog praznjenja deponija željeza u jetri (Slika 8.) (Widdowson i McCance, 1947). Međutim, nakon navedenog perioda ponovno je uočen nagli porast sadržaja željeza u ženki koji prati porast estrogena te on očekivano nadilazi sadržaj željeza u mužjaka.



**Slika 8.** Grafički prikaz koncentracije željeza u jetri ženki i mužjaka štakora.  
(Widdowson i McCance, 1947).

Starosne razlike u nakupljanju željeza također su obrađene radom Widdowson i McCance, 1947 međutim razlike u ekspresiji feritina dosada još nisu dovoljno ispitane te postoji ograničen izvor dostupnih informacija o navedenoj temi. Međutim, zasigurno znamo da se nakupljanje željeza starenjem povećava dok isti trend, mada vrlo vjerojatan, još nije istražen kod feritina. Naime, starosne razlike s obzirom na sadržaj feritina nisu istražene, a kako željezo mora biti strogo kontrolirano svaka veća razina slobodnog željeza koje generira veću količinu ROS ujedno može biti jednim od potencijalnih patofizioloških mehanizma procesa starenja.

## 1.5. SPOLNE RAZLIKE U SADRŽAJU FERITINA

Dvadesetak godina nakon spoznaje spolnih razlika u sadržaju željeza istraživanja pokazuju nalaze da razlike u količini željeza jasno koreliraju sa spolnim razlikama u ekspresiji feritina u ženkama i mužjacima (Bjørklid i Helgeland, 1970; Linder i sur., 1973). Pretpostavlja se da feritin prati nakupljanje željeza, što je trenutno prihvaćena činjenica potkrepljena mnogim studijama od onih provedenih na životinjama do biokemijskih in vitro

studija sa pročišćenim feritinskim nanokavezom. Daljnja istraživanja su pokazala spolne razlike u prisutnosti hepcidina u korist ženki koji bi već prije opisanim mehanizmima bio odgovoran za akumulaciju željeza u jetri te povećanu ekspresiju feritina u ženki naspram mužjaka (Kong i sur., 2014; Sangkhae i Nemeth, 2017).



## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Ranija istraživanja pokazuju da se nakupljanje i skladištenje željeza u jetri sisavaca razlikuje ovisno o spolu (Widdowson i McCance, 1948, 1953). U modelu eksperimentalnih životinja štakora pokazano je da je nakupljanje željeza u jetri mužjaka znatno manje nego u ženki. Također uočeno je da kastracija mužjaka povećava, obrada testosteronom smanjuje, ovariektomija smanjuje, a obrada estrogenom pojačava nakupljanje željeza u jetri ženki. Ove spolne razlike u nakupljanju željeza ne postoje u prepubertetskih životinja, nego se pojavljuju tijekom spolnog sazrijevanja. Spolne razlike istraživane su i na razini ekspresije feritina, glavnog skladišnog proteina željeza. Rezultati potonjih istraživanja u jetri su jednoznačni, jasno ukazuju na postojanje spolnih razlika te da jetra mužjaka u odraslog štakora ima manji sadržaj feritina nego u ženki (Bjørklid i Helgeland, 1970; Linder i sur., 1973). Time su potvrđene spolne razlike u količini željeza i feritinskog kompleksa koji kao proteinska sfera, odnosno nanokavez, skladišti željezo te tako osigurava stanicama prisustvo željeza u slučaju potrebe, a istovremeno sprječava toksičnost koju slobodno željezo može uzrokovati. Slobodno željezo uz vodikov peroksid Fenton reakcijom katalizira stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta koje uzrokuju neminovnu štetu organizmu. Oštećenja bioloških molekula koja nastaju povećanjem razine reaktivnih kisikovih radikala doprinose starenju stanica, razvoju bolesti i u pozadini su gotovo svih oboljenja organizma. Uočena korelacija željeza sa oboljenjima i starenjem organizma otvara prostor intervencijama za zdraviji i dulji život.

Utjecaj gonadektomije i starenja nije istražen na proteinskoj razini ekspresije feritinskih lanaca u sisavaca. Nadalje, imunokemijske metode nove generacije dosada još nisu primijenjene za detaljno praćenje raspodjele i količine lakog i teškog lanca feritina u fiziologiji spolnih i starosnih razlika u jetri, a navedeno je bitno pri uspostavljanju metodološkog okvira za buduća fiziološka i toksikološka istraživanja. Radna hipoteza ovog istraživanja je da protutijela razvijena protiv humanog lakog i teškog lanca feritina zbog visoke evolucijske očuvanosti aminokiselinskih sekvenca rade i u glodavcima; te da primijećene spolne razlike u nakupljanju željeza u jetri sisavaca (Ljubojević i sur. 2019) postoje paralelno s različitom razinom ekspresije oba proteinska lanca feritina odgovorna za skladištenje željeza, te da je za to odgovoran ili stimulacijski učinak estrogena ili inhibicijski učinak androgena ili oboje. Osim toga, pretpostavlja se da povećanje nakupljanja željeza u jetri

životinja oba spola starenjem uzrokuje povećanje ekspresije obje podjedinice feritinskog kompleksa u stanicama jetre kao prve linije obrane od nakupljanja željeza i posljedično većeg opterećenja slobodnim kisikovim vrstama (ROS). Cilj navedenog istraživanja je ustanoviti moguće spolne razlike u raspodjeli i sadržaju obje podjedinice feritinskog kompleksa, LLF i TLF, u jetri spolno zrelih štakora oba spola, te nakon gonadektomije spolno zrelih životinja ustanoviti koji su hormoni odgovorni za te spolne razlike. Nadalje, ustanoviti da li se starenjem, odnosno kod dvogodišnjih životinja, spolne razlike održavaju. U ovim pokusima korištene su metode imunohistokemije u narescima fiksiranog tkiva jetre i western analiza homogenata izoliranih iz jetre, te specifična monoklonska protutijela za LLF i TLF.

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

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada te je 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. PUFERI I OTOPINE

Fosfatni pufer (PBS)	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - pH 7.4.
Pufer za izolaciju homogenata (homo-pufer)	300 mM manitol, 5 mM etilen-glikol-bis (β-aminoetileter) - 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 βME u omjeru 17:3.
Otopine i puferi za SDS - poliakrilamidnu gel elektroforezu (SDS-PAGE)	akrilamid/ bis-akrilamid: 30 g poliakrilamida/ 0.8 g bis-akrilamida u 100 ml H <sub>2</sub> O. Skladišti se na 4°C do upotrebe.
	pufer A – pufer za pripravljanje gela za odjeljivanje (engl. separating gel): 1.5 M Tris-HCl, pH 8.9 (18.17 g/ 100 ml).
	pufer B – pufer za pripravljanje gela za sabijanje (engl. stacking gel): 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (6.06 g/ 100 ml).
	amonijev persulfat (APS): 100 mg/ 7.1 ml H <sub>2</sub> O – napravljen svjež.
	10 % (m/v) SDS u H <sub>2</sub> 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.
Fikisacija proteina na PVDF membranu	1% glutaraldehid (u dH <sub>2</sub> O)
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 : reH <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.

### 3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR

Od tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD) korišteni su 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), TEMED (N, N, N',N'- tetrametiletilendiamin). Proizvodi Coomassie Brilliant Blue G-250 i SDS (Na-dodecil-sulfat) korišteni su od tvrtke Serva (Heidelberg, Njemačka). Od tvrtke Boehringer (Mannheim, Njemačka) nabavljeni su: tris, akrilamid, bisakrilamid, a od različitih tvrtki korišteni su slijedeći proizvodi: od Chassot (Bern, Švicarska): Narketan i Xylapan; od EMS (Los Almitos, CA, SAD): paraformaldehid; od Merck (Darmstadt, Njemačka): glicerol; od Kemike (Zagreb, Hrvatska): natrijev citrat, limunska kiselina, izopropanol, etanol; od Vector Labs (Burlingame, CA, SAD) otopinu za očuvanje fluorescencije (Vectashield), od Tissue-Tek, Sakura Finetek (Torrance, CA, SAD) uklopni medij (O.C.T. Compound 4583); od tvrtke Sorvall Instruments (Newtown, CT, SAD): centrifuga s hlađenjem (Sorvall RC2B, rotor SS-34), NaN<sub>3</sub> (natrijev azid), amonijev persulfat (APS), električni homogenizator (Powergen 125), predmetna stakalca (Superfrost/Plus Microscope slides); od Cole-Parmer (Chicago, IL, SAD): pumpa za perfuziju (Masterflex pumpa); od Cambridge (Engleska, UK): spektrofotometar (CECIL 9000); od BioRad (Hercules, CA, SAD):  $\beta$ -merkaptioetanol ( $\beta$ -ME), aparatura Mini Protean III Cell, MiniTrans-Blot Cell za SDS-PAGE kao i od Millipore (Bedford, MA, SAD): hidrofobna najlonska membrana, Immobilon (Polyvinylidene fluoride, PVDF); od Fermentas (FisherScientific, Co): uzorak standarda molekulskih masa proteina; od Leica Instruments (Nussloch, Njemačka): kriomikrotom (Leica CM 1580); od Opton Feintechnik (Oberkochen, Njemačka): fluorescencijski mikroskop (OPTON III RS); te od Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, SAD): digitalna kamera (SPOT RT).

### 3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE

a) pokusi spolnih i starosnih razlika:

U svim pokusima korišteni su mužjaci i ženke štakora soja Wistar (Slika 9.), tri mjeseca (odrasli) i dvije godine (stari), uzgojeni u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Životinje su uzgojene u kontroliranim uvjetima, s periodičnom izmjenom svjetla i tame svakih 12 sati i stalnoj temperaturi od 24°C, uz slobodan pristup hrani i vodi tijekom pokusa.

b) pokusi gonadektomije:

Za pokuse utjecaja spolnih hormona na ekspresiju feritina mužjaci su kastrirani kroz skrotum, dok su ženke ovarijektomirane dorzalnim (lumbalnim) putem. Lažno gonadektomirane životinje prošle su isti operativni postupak, ali im gonade nisu odstranjene. Operacije su provođene uz primjenu odgovarajuće anestezije (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p.). Osam dana nakon operacije životinje su žrtvovane.



**Slika 9.** Štakori soja Wistar korišteni kao eksperimentalni animalni modeli tijekom istraživanja. (www.criver.com.)

### 3.4. PROTUTIJELA

Za imunokemijske metode Western analizu i imunocitohistokemiju korištena su sljedeća protutijela:

#### 3.4.1. Primarna protutijela

Komercijalno dostupna monokonska protutijela na laki lanac feritina (*engl.* ferritin light chain antibody (D-1): sc-390558) i teški lanac feritina (*engl.* ferritin heavy chain antibody (B-12): sc-376594), proizvod tvrtke Santa Cruse Biotechnology, Inc. CA, USA. Protutijelo prepoznaje humani visokokonzervirani aminokiselinski slijed specifičan za pojedinu podjedinicu feritina. Iako su protutijela rađena na ljudske forme, zbog visoke očuvanosti aminokiselinskih sekvenca, homologija sa štakorskim slijedom je visoka.

```
>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      MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSG 60
NP_036980.1      MTTASPQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSCYFDRDDVALKNFAKYFLHQSG 60
*****

NP_002023.2      HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKPPDCDDWESGLNAMECALHLEKVNQSLLELHK 120
NP_036980.1      HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKPPDRDDWESGLNAMECALHLEKSVNQSLLELHK 120
*****

NP_002023.2      LATDKNDPHLCDFIETHYLNQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSD 180
NP_036980.1      LATDKNDPHLCDFIETHYLNQVKSIKELGDHVTNLRKMGAPESGMAEYLFDKHTLGHGD 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      MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASytyLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKR 60
NP_071945.3      MTSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLHLRASytyLSLGFYFDRDDVALEGVGHFFRELAEEKR 60
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

NP_000137.2      EGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKPAEDEWGTKPDAMKAAMALEKKNLQALLDLHALGSA 120
NP_071945.3      EGAERLLKQNERGGRALFQDVQKPSQDEWGTKLEAMEAALALEKKNLQALLDLHALGSA 120
** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

NP_000137.2      RTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPE-----AGLGEYLFERLTL 172
NP_071945.3      RTDPHLCDFLESHFLDKEVKLIKMGDHLTNLRRVAGPQPAQTGVAQASLGEYLFERLTL 180
*****

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

**Slika 10.** Prikaz visoke homologije aminokiselinskog slijeda obje sekvence feritina između ljudi i štakora ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), linija iznad sljedova aminokiselina u obje podjedinice označava peptidne sekvence korištene za razvoj specifičnih protutijela protiv TLF i LLF.



Homologija je provjerena za obje sekvence sa aplikacijama dostupnim na internetu (Slika 10.). Sljedovi aminokiselina LLF poklapaju se ~ 84.5 % između humanih i štakorskih, dok se kod TLF preklapaju ~ 94.5 %. Laki i teški lanac feritina imaju međusobnu homologiju kod čovjeka ~ 55%, a u štakora ~ 53%. Proteinske sekvence, odnosno sljedovi aminokiselina koji su se koristili za razvoj protutijela kod oba lanca visoko su homologni i ukazuju da bi vrlo vjerojatno protutijela razvijena na humane peptide iz LLF i TLF mogla raditi i u štakora.

Protutijela prepoznaju proteinske pruge očekivane molekulske mase ~ 20 kDa (laki lanac feritina, LLF, u razrijeđenju 1:1000) i ~ 21 kDa (teški lanac feritina, TLF, u razrijeđenju 1:500) u western analizi, dok imunohistokemijski intracelularno bojaju hepatocite jetre štakora.

### **3.4.2. Sekundarna protutijela**

Sekundarna protutijela nabavljena su komercijalno i korištena prema uputama proizvođača.

Sekundarno protutijelo u imunohistokemiji na oba monoklonska primarna protutijela (D-1 i B-12) bilo je magareće protutijelo protiv mišjeg IgG-a (*engl.* donkey anti-mouse CY3, DAM-CY3), koje je potom obilježeno fluorescirajućom molekulom CY3 (daje crvenu fluorescenciju) u razrjeđenju 1:400.

Sekundarno protutijelo u western analizi za oba monoklonska primarna protutijela (D-1 i B-12) bilo je kozje protutijelo protiv mišjeg IgG-a (*engl.* goat anti-mouse AP; GAM-AP) koncentracije 0.25 µg/ml, obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom u razrjeđenju 1:1000.

Navedena sekundarna protutijela proizvod su tvrtke Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD.

### **3.5. METODE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.5.1. Izolacija homogenata iz jetre i bubrega**

Za izolaciju homogenata primjenjena je metoda diferencijalnog centrifugiranja. Štakori su usmrćeni prekidanjem vratne kralježnice. Izvađena jetra i bubrezi su odmah stavljeni u hladni PBS. Usitnjena tkiva organa su odvagana i pripremljeni su 10%-tni homogenati. Uzorci su stavljeni u hladni homo-pufer, kojem su dodani inhibitori proteaza: 1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina i 0.1 µg/ml antipaina i potom homogenizirani električnim homogenizatorom Powergen 125; 1 min homogenizacija na najjačoj brzini – 2 min pauza – 1 min homogenizacija. Svi postupci su izvedeni na niskoj temperaturi (ledena površina pri rezanju tkiva i ledeni puferi). Homogenati su centrifugirani u centrifugi Sorvall RC2B s hlađenjem na 6,500 rpm (5,000 g) tijekom 15 min; time su se istaložile cijele stanice, jezgre, mitohondriji i nerazgrađeni tkivni matriks. Dobiveni nadtalog se koristio kao uzorak homogenata. U uzorcima se odredila koncentracija proteina. Uzorci su priređeni sa Laemmli puferom na iste koncentracije i zamrznuti na -20°C do upotrebe. U ovim uzorcima određivani su sadržaji obje podjedinice feritina metodom western analize.

#### **3.5.2. Određivanje koncentracije proteina**

Koncentracija proteina u uzorcima izoliranih membrana mjerena je spektrofotometrijski, metodom po Bradfordu (1976). Osnovni princip ove metode temelji se na reakciji vezanja boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteine, pri čemu boja mijenja svoje ionsko stanje, te apsorbira svjetlost valne duljine od 595 nm. Standardna krivulja koncentracije proteina izrađena je mjerenjem otopine albumina iz seruma goveda u koncentracijskom rasponu od 0.2 – 1.2 mg/ml. Osjetljivost metode je 0.1 mg/ml. Uzorci su razrjeđivani tako da im je optička gustoća bila u linearnom području standardne krivulje, te im je nakon 10 minuta stajanja u otopini boje, očitavana gustoća naspram slijepe probe (uzorak bez proteina). Navedena mjerenja izvedena su spektrofotometrom CECIL 9000. Pripadajuće koncentracije proteina očitane su iz standardne krivulje.

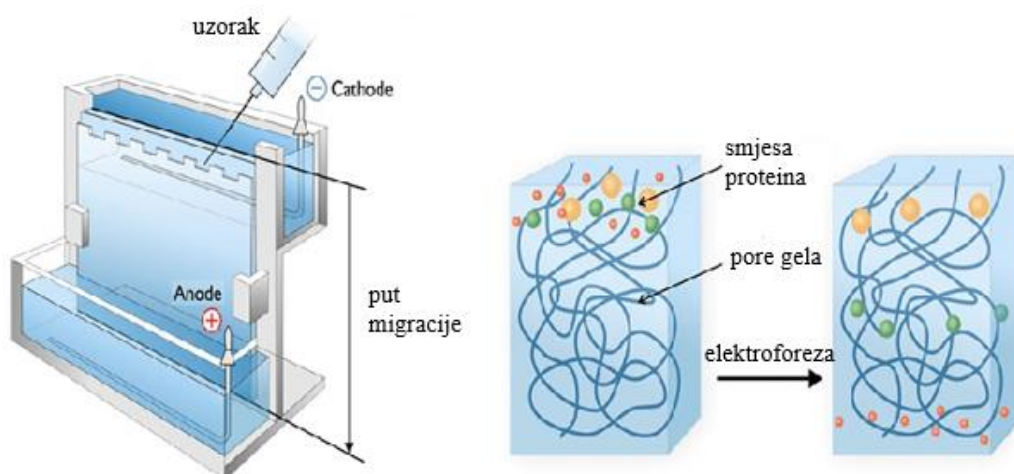
Masa izmjerenih proteina izračuna se prema formuli:

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

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

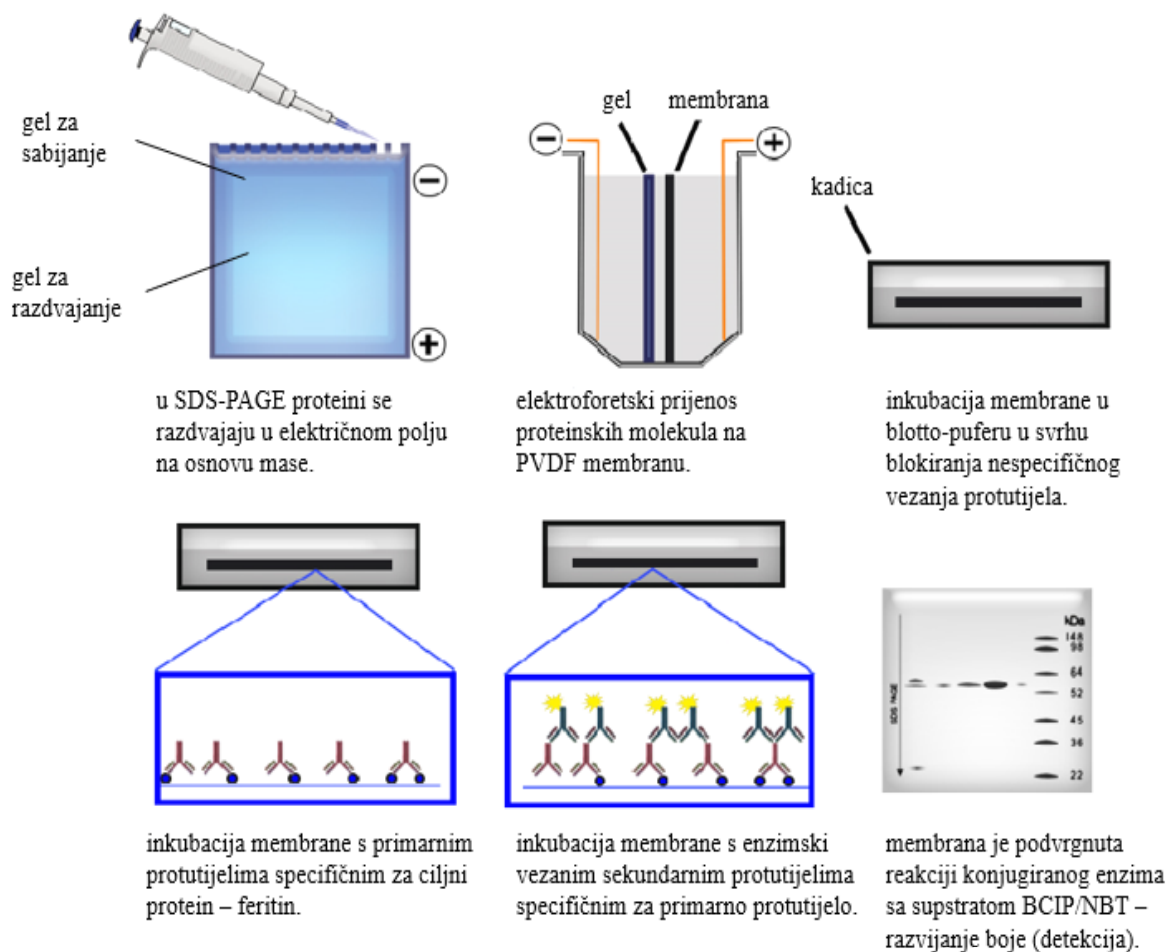
Koncentracija proteina u pripravcima homogenata podesila se na 4 mg/ml. Uzorci su priređeni za SDS-PAGE miješanjem s Laemmli puferom za denaturaciju proteina. Konačna koncentracija proteina je bila 3 mg/ml u smjesi koja je, osim proteina, sadržavala i 1% SDS, 12% (v/v) glicerol, 30 mM Tris/HCl (pH 6.8), BPB u tragovima i 5%  $\beta$ ME. Uzorci su dodatno denaturirani zagrijavanjem na različitim temperaturama radi ustanovljavanja osjetljivosti pojedinih antigena na termičku obradu kod 37°C tijekom 30 min ili 65°C tijekom 15 min ili 95°C tijekom 5 min. Za proteniske pruge obje podjedinice feritina optimalni uvjeti bili su 95°C tijekom 5 min.

U SDS-PAGE proteini se razdvajaju u električnom polju na osnovu mase proteinske molekule obložene negativnim nabojem detergenta SDS, tako da je priređeni put u gelu obrnuto proporcionalan logaritmu molekulske mase proteina (Slika 11.). Putovanje proteina započinje u električnom polju kroz gel za sabijanje, koji je niže pH vrijednosti i koncentracije, a zatim slijedi razdvajanje u separacijskom gelu (20%-tnom) (Laemmli, 1970). Paralelno s proteinima homogenata jetre 60-80  $\mu$ g ponekad se razdvajao i uzorak standarda molekulskih masa u rasponu 10-200 kDa, prethodno priređen na isti način kao i uzorak smjese proteina.



**Slika 11.** Razdvajanje proteinskih molekula obloženih negativnim nabojem detergenta SDS u električnom polju na osnovu mase, tako da je prijeđeni put u gelu obrnuto proporcionalan logaritmu molekulske mase proteina. (www.slideshare.net)

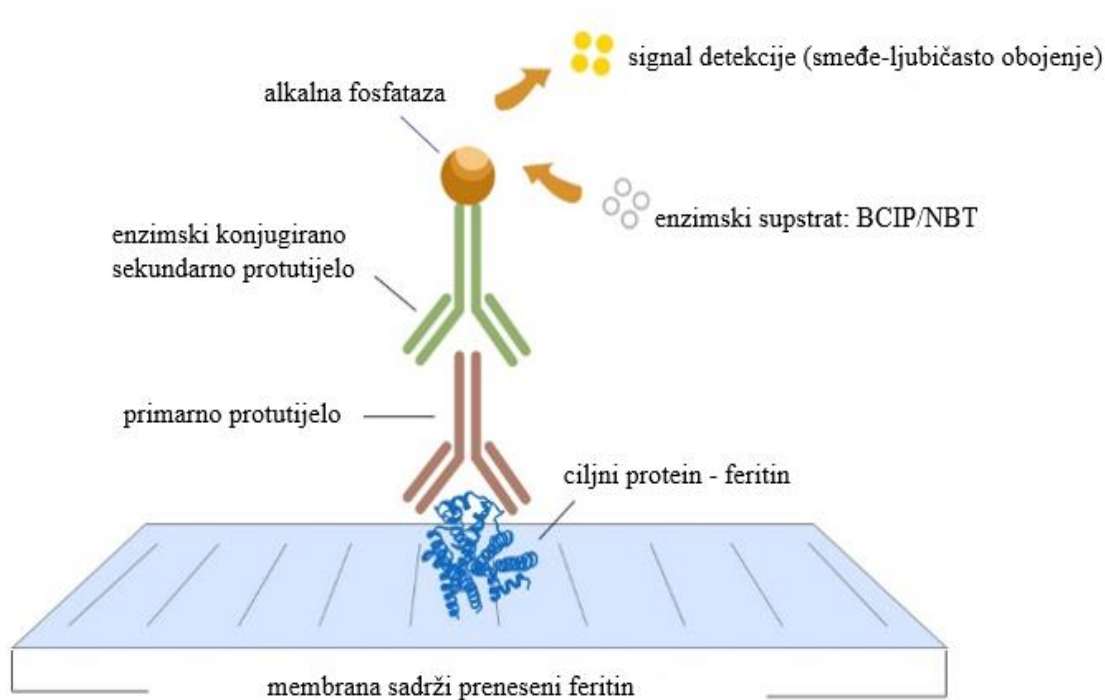
Za izvedbu SDS-PAGE korištena je aparatura Mini Protean III Cell uz konstantan napon od 110 V tijekom 3 sata. Dobiveni gel dalje se podvrgava elektroforetskom prijenosu proteinskih molekula na hidrofobnu najlonsku membranu Immobilon (PVDF) u aparaturi MiniTrans-Blot Cell, uz konstantni napon 100 V tijekom 2 sata. Da bi proteine malih molekulske masa zadržali na PVDF membrani nakon transfera, odnosno elektroforetskog prijenosa proteinskih molekula na membranu, ista se inkubira 30 min u 1%-tnoj otopini glutaraldehida. Uspješnost prijenosa razdijeljenih proteina iz gela na membranu provjerena je nakon kratkotrajnog bojanja membrane otopinom Coomassie blue, te ispiranja u otopini za odbojavanje. Potom su membrane inkubirane 1 sat u blotto-puferu u svrhu blokiranja nespecifičnog vezanja protutijela. Ovako obezbojene i blokirane membrane su inkubirane s otopinom s primarnim protutijelima (razrijeđenim u blotto-puferu) preko noći uz miješanje na 4°C. Razrjeđenje protutijela za LCF bilo je 1:1000, a HCF 1:500. Zatim su membrane višekratno ispirane blotto-puferom bez protutijela, nakon čega je slijedila inkubacija tijekom 1 sata u sekundarnom protutijelu na sobnoj temperaturi (Slika 12.).



**Slika 12.** Sažeti prikaz prethodno opisanog postupka od početnog razdvajanja proteinskih molekula u SDS-PAGE do konačne detekcije feritina kolorimetrijskom metodom.

(www.biolegend.com)

Sekundarno protutijelo na primarna monoklonska protutijela za obje podjedinice feritina bilo je GAM-AP koncentracije 0.25 µg/ml. Nakon ponovnog ispiranja blotto-puferom 3x10 min i PBS 2x5 min, membrane su podvrgnute reakciji konjugiranog enzima alkalne fosfataze sa supstratom BCIP/NBT u alkalnom puferu (20 mM Tris, pH 9). Razvijanje boje temelji se na oksidacijskoj reakciji nakon djelovanja alkalne fosfataze na supstrat BCIP/NBT pri čemu na mjestima vezanja sekundarnog na primarno protutijelo (koje je vezano za antigen) nastaje smeđe-ljubičasto obojenje (Slika 13.). Naime, nakon odvajanja Pi od 5-bromo-4-kloro-3-indolila, oksidacijom nastaje indigo, koji reducira NBT u diformazan i time nastaje netopljivi obojani smeđe-ljubičasti talog. Jačina obojenja taloga razmjerna je količini prisutnog antigena, što omogućuje denzitometrijsku procjenu sadržaja antigena u uzorcima.



**Slika 13.** Shematski prikaz kolorimetrijske detekcije feritina metodom Western blota.

(www.ispybio.com)

### 3.5.4. Denzitometrija

Denzitometrijska mjerenja procjene relativnog sadržaja antigena u dobivenim prugama nakon western analize izvršena su pomoću programa Image J (NIH, Bethesda, SAD). Svaki uzorak na western analizi uokviri se na jednakoj površini sa proteinskom prugom, te se izvrši mjerenje gustoće obojenja. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti naspram gustoće najjače pruge (=1) izmjerene u kontrolnoj skupini uzoraka. Prikazi blotova western analize obrađeni su u programu Adobe Photoshop 6.0.

### 3.5.5. Fiksiranje tkiva *in vivo*

Eksperimentalne životinje, štakori oba spola, su uspavani odgovarajućim omjerom dvokomponentnog anestetika (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p).

Krvožilni sustav je potom perfundiran kroz srce prvo PBS-om (zagrijan na 37°C i aeriran s mješavinom plinova 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>) tijekom 2-3 minute radi odstranjivanja krvi iz cirkulacije, a zatim svježe pripremljenim fiksirajućim sredstvom (4% paraformaldehid) tijekom narednih 4-5 min. Izvađena jetra je narezana poprečno u više narezaka i dodatno fiksirana tijekom noći u istom fiksativu na 4°C. Tkiva su nakon toga ispirana u PBS-u 4x10

min i pohranjena do daljnje uporabe na 4°C u PBS koji je sadržavao 0.02% NaN<sub>3</sub> koji ima ulogu konzervansa.

### 3.5.6. Tkivni narezci i posredna imunofluorescencija

Postupak pripreme tkivnih narezaka počinje namakanjem fiksiranog uzorka tijekom nekoliko sati u 30%-tnoj saharozi (u PBS-u) radi zaštite staničnih struktura od razaranja pri niskim temperaturama. Tkivo je potom uklopljeno u polimerni uklopni medij O.C.T. Compound 4583, smrznuo u kriostatu na temperaturu od –25 °C, narezano u rezove debljine 4 µm kriomikrotomom Leica CM 1580 (Slika 14.) te su dobiveni uzorci naljepljeni na predmetna stakalca Superfrost/Plus Microscope slides.

Narezci tkiva jetre na predmetnim stakalcima su najprije rehidrirani namakanjem u PBS-u 10 min. Optimalni uvjeti za imunohistokemijsko obilježavanje obje podjedinice feritina pokazali su da je prethodno utvrđena procedura najpovoljnija za tkivo, a uključivala je obradu neionskim detergentima i kuhanje u citratnom puferu pH 6. Za obojenje jezgri korištena je boja Hoechst 33342 u 0.01% koncentraciji 2 min, nakon čega su uzorci dodatno ispirani.



**Slika 14.** Kriomikrotom za izradu konsektivnih nerezaka jetre potrebnih za imunohistokemiju. (www.sakuraus.com)

### **3.5.7. Kuhanje u citratnom puferu pH 6 i obrada neionskim detergentom**

Nakon rehidracije namakanjem u PBS-u 10 min, tkivni naresci su kuhani u 10 mM citratnom puferu pH 6 tijekom četiri ciklusa od 5 min, kako bi epitopi postali dostupniji protutijelima, te su zatim ostavljeni u istom puferu 20 min da se ohlade pri sobnoj temperaturi. Naresci su dalje ispirani (3 x 5 min) u PBS-u, a zatim ispirani u 0.5% Tritonu X-100 (u PBS-u) 15 min, u 2% Tritonu X-100 (u PBS-u) 30 min. Zatim su svi naresci namakani u 1%-tnoj otopini BSA (u PBS-u) tijekom 30 min radi blokiranja nespecifičnog vezanja protutijela, te su potom inkubirani s primarnim protutijelom na feritin (razrijeđen u PBS-u) preko noći (12–14 h) na 4°C. Naresci su zatim isprani u 0.1% Tritonu X-100 (u PBS) 10 min, te (3 x 5 min) u PBS-u kako bi se isprala nespecifično vezana protutijela, te inkubirani u otopini DAM-CY3 (razrjeđenje 1:400 prema uputama proizvođača) u PBS-u na sobnoj temperaturi tijekom 1h. Nakon ponovna ispiranja u 0.1% Tritonu X-100 (u PBS-u) 10 min i 2 x 5 min u PBS-u. Za obojenje jezgri korištena je boja Hoechst 33342 (Sigma Aldrich-Merck) u 0.01% koncentraciji 2 min, nakon čega su uzorci dodatno isprani 2 x 5 min u PBS-u. Svi preparati tkivnih narezaka prekriveni su otopinom Vectashield razrijeđenom 1:1 u alkalnom puferu (Tris pufer A za SDS-PAGE, pH 8.5) i pokrovnim stakalcem.

Svi obrađeni tkivni naresci su zatim promatrani fluorescencijskim mikroskopom OPTON III RS, koristeći SPOT RT Slider digitalnu kameru i program (Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI). Za obradu slika je korišten računalni program Adobe Photoshop 6.0. Na prikazanim slikama CY3 crvena fluorescencija je pretvorena u crno-bijelu pomoću navedenog programa.

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

Rezultati pokusa imunohistokemije i western analize prikazani su reprezentativnim nalazom (slikom) za 4 neovisne eksperimentalne životinje. Rezultatima imunohistokemije dobivamo uvid u distribuciju intracelularnog feritina u hepatocitima jetre, te su prikazani slikama koje iako su rezultat subjektivnog probira, predstavljaju reprezentativne dobivene rezultate. Western blot jasno pokazuje količinu ciljnog proteina i potvrđuje rezultate dobivene imunohistokemijski. Navedene metode moraju biti u korelaciji. Brojčani rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SP), a podaci su statistički obrađeni ili



Studentovim t-testom ili testom ANOVA/Duncan na razini vjerodostojnosti od 5%. Za statističku obradu i grafički prikaz korišten je računalni program Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD).

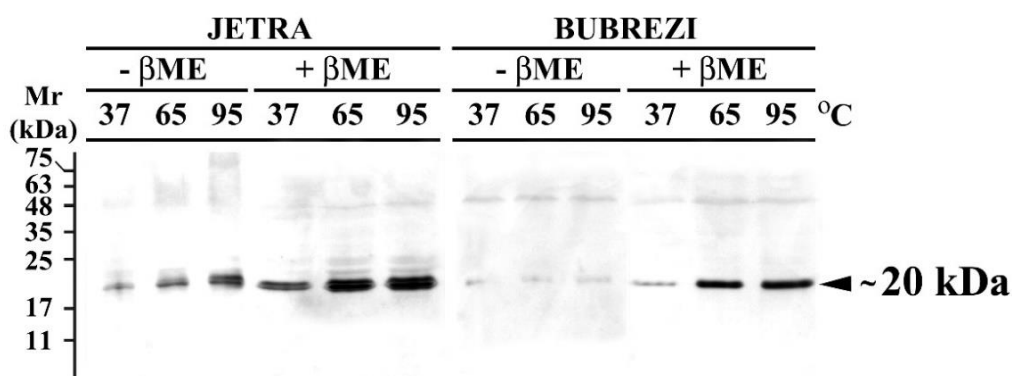
## **4. REZULTATI**

U nastavku su prikazani rezultati raspodjele i količine obiju podjedinica feritina u jetri s obzirom na spolne i starosne razlike dobiveni imunokemijskim metodama. Nadalje, ispitani su optimalni uvjeti za protutijela na laki i teški lanac feritina te uočena razlika ekspresije u jetri koja ima glavnu ulogu u skladištenju željeza u organizmu i bubregu koji je odgovoran za njegovu reciklažu.

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

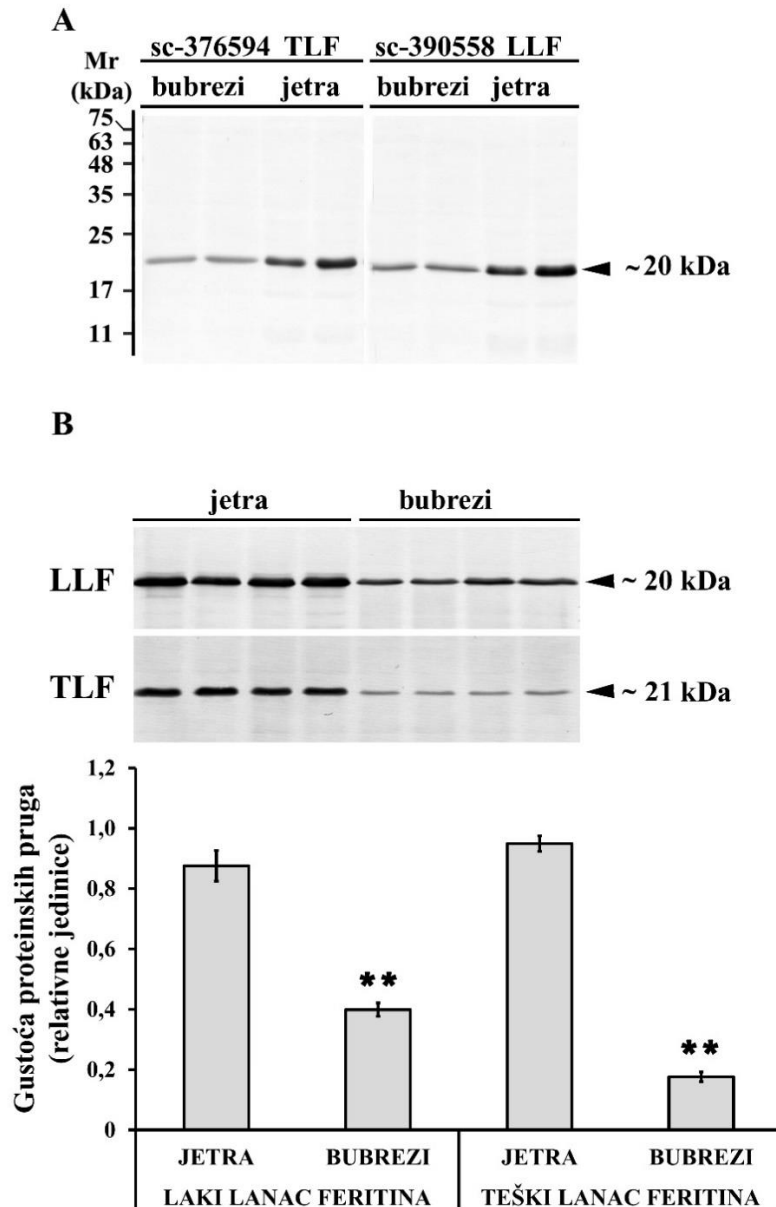
U svrhu provjere specifičnosti obilježavanja protutijela u imunokemijskim metodama te za postizanje što veće učinkovitosti u istim, ispitati smo optimalne uvjete za western analizu i imunohistokemiju.

Najprije smo ispitali optimalne uvjete za protutijelo na laki lanac feritina na uzorcima bubrega i jetre štakora. Uzorke smo pripremili u reducirajućem (+  $\beta$ ME) i nereducirajućem (-  $\beta$ ME) puferu za denaturaciju proteina, te smo ih dodatno termički obradili pri različitim temperaturama u različitom vremenu (95 °C/5 min, 65 °C/15 min i 37 °C/30 min).



**Slika 15.** Imunoblot lakog lanca feritina (LLF) u uzorcima bubrega i jetre štakora. Najbolje obojenje daje LLF proteinska pruga u reducirajućim uvjetima uz termičku obradu pri 95 °C kroz 5 minuta.  $\beta$ -ME,  $\beta$ -merkaptoetanol.

Prema prikazu na slici 15 imunoblot inkubiran sa protutijelom na LLF (D-1), daje najjače obojenje proteinske pruge od ~ 20 kDa u reducirajućim uvjetima uz termičku obradu pri višoj temperaturi (+  $\beta$ ME, 95 °C/5 min), ukazujući na potrebu da se denaturiraju disulfidne veze u feritinskom kompleksu nanokaveza pri čemu važnu ulogu ima otpornost epitopa pri povišenoj temperaturi.

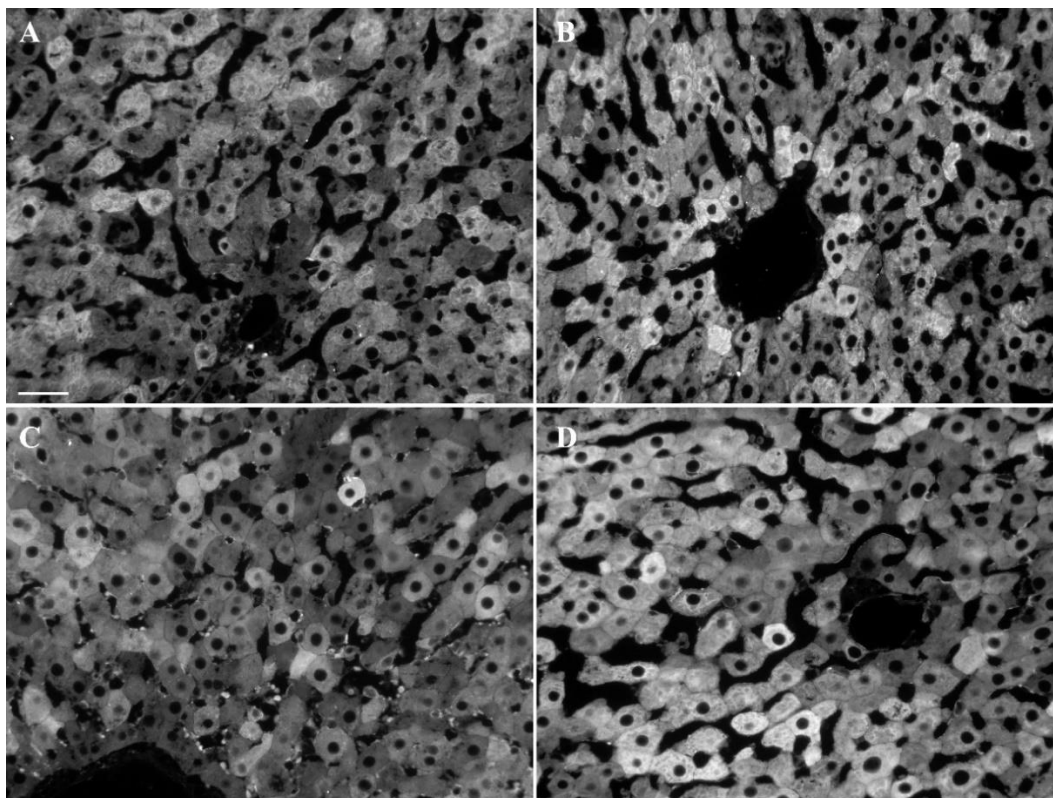


**Slika 16.** Imunoblot teškog i lakog lanca feritina u uzorcima jetre i bubrega (A) i kvantifikacija uočene razlike u ekspresiji obje podjedinice feritina u navedenim organima (B). Usporedbom proteinskih pruga za LLF i TLF zapaženo je jače obojenje u korist LLF (A). Također, proteinske pruge obiju feritinskih podjedinica su statistički značajno jače izražene u jetri naspram bubrega (B), rezultat je očekivan s obzirom na činjenicu da je jetra glavni skladišni organ željeza.

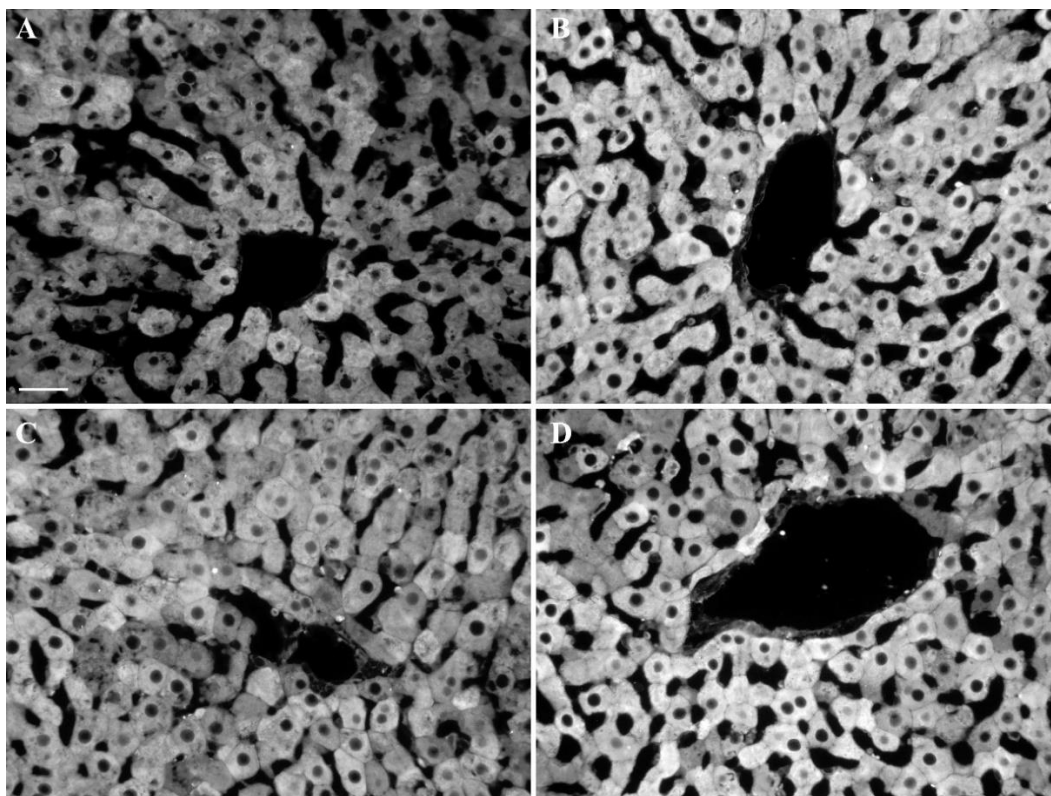
Nakon što smo utvrdili optimalne uvjete za protutijelo na laki lanac feritina, ispitali smo protutijelo na teški lanac feritina pri istim uvjetima. Rezultati dobiveni protutijelima na laki i teški lanac feritina pri 95 °C tijekom 5 minuta su potpuno usporedivi (nije prikazano). Oba su protutijela korištena za imunohistokemiju i western analizu u daljnjim istraživanjima, uzimajući u obzir utvrđene optimalne uvjete za imunokemijske analize. Nadalje, pri ispitivanju optimalnih uvjeta za protutijela uočena je razlika u jačini obojenja dobivenih proteinskih pruga u ispitivanim organima. Proteinske pruge TLF i LLF su puno slabije izražene u bubrezima (Slika 16B.), što ukazuje na jaču ekspresiju feritina u jetri.

#### **4.2. RASPODJELA I KOLIČINA LAKOG I TEŠKOG LANCA FERITINA S OBZIROM NA SPOLNE I STAROSNE RAZLIKE U JETRI ŠTAKORA**

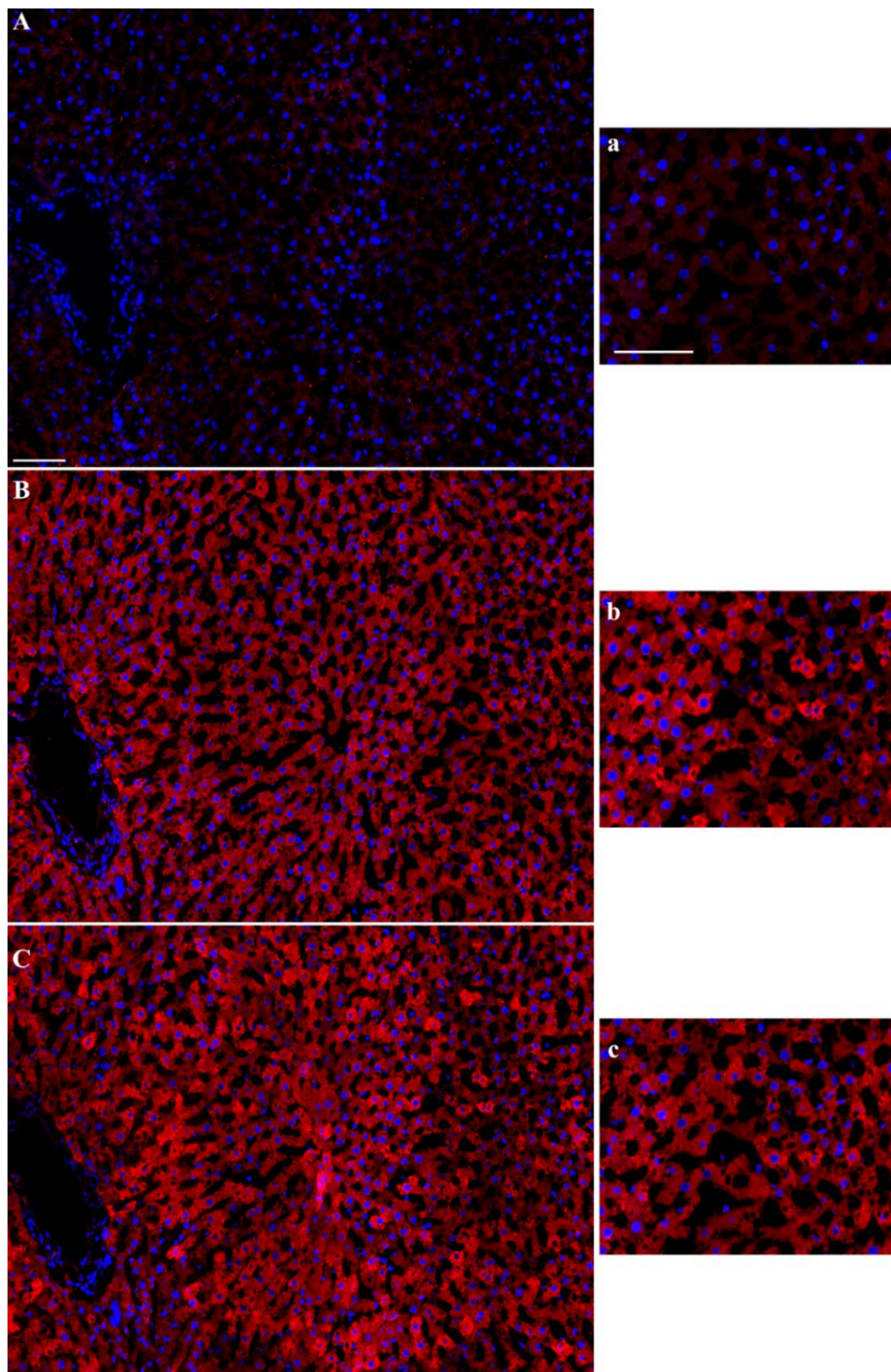
Radi utvrđivanja spolnih i starosnih razlika u distribuciji lakog i teškog lanca feritina, pripremili smo 4µm kriosekcije jetre dvogodišnjih i tromjesečnih mužjaka i ženki štakora od kojih su poneke bile konsekutivni naresci. Uvjeti pozitivnog obojenja su za oba protutijela zahtjevali dodatno otkrivanje epitopa (*engl.* antigen retrieval) za koji je optimum kuhanje u citratnom puferu pH 6 i obrada različitim koncentracijama deterdžentom T-X-100 (nije prikazano). Imunohistokemijski nalazi raspodjele LLF i TLF u narescima jetre štakora pokazali su snažno intracelularno obojenje u hepatocitima oko centralne vene. Primjećena je slična raspodjela, odnosno obrazac obojenja kroz jetru bio je isti kod mužjaka i ženki, međutim ukupna jačina obojenja bila je zamjetno jača u ženki i ukazivala je na prisutnost spolnih razlika. Nadalje, obojenje u tromjesečnih životinja bilo je slabijeg intenziteta u odnosu na dvogodišnje životinje.



**Slika 17.** Imunohistokemijski prikaz obojenja lakog lanca feritina (LLF) u hepatocitima jetre tromjesečnog mužjaka (A), tromjesečne ženke (C), dvogodišnjeg mužjaka (B) i dvogodišnje ženke (D) štakora. LLF u ženki (C, D) pokazuje zamjetno jače obojenje u odnosu na mužjake (A, B) štakora. Također, uzorci jetre dvogodišnjih životinja (B, D) pokazuju intenzivnije obojenje naspram tromjesečnih životinja (A, C). Na prikazanim slikama CY3 crvena fluorescencija je pretvorena u crno-bijelu pomoću računalnog programa Adobe Photoshop 6.0. Mjera 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 18.** Imunohistokemijski prikaz obojenja teškog lanca feritina (TLF) u hepatocitima jetre tromjesečnog mužjaka (A), tromjesečne ženke (C), dvogodišnjeg mužjaka (B) i dvogodišnje ženke (D) štakora. TLF u ženki (C, D) pokazuje zamjetno jače obojenje u odnosu na mužjake (A, B) štakora. Također, uzorci jetre dvogodišnjih životinja (B, D) pokazuju intenzivnije obojenje naspram tromjesečnih životinja (A, C). Na prikazanim slikama CY3 crvena fluorescencija je pretvorena u crno-bijelu pomoću računalnog programa Adobe Photoshop 6.0. Mjera 20  $\mu\text{m}$ .

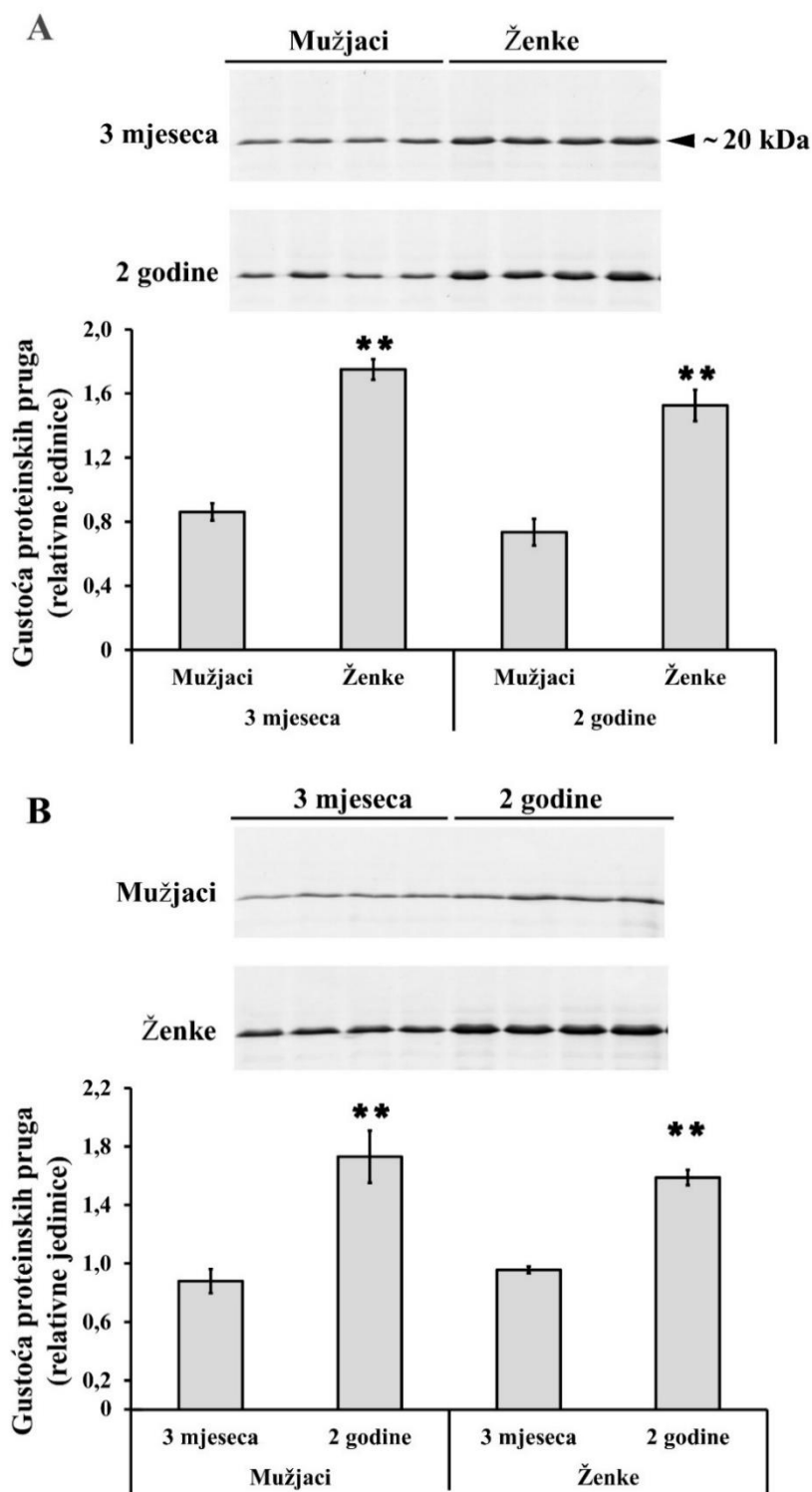


**Slika 19.** Imunohistokemijsko obojenje podjedinica feritina u konsektivnim tkivnim naresecima jetre tromjesečne ženke štakora bez inkubacije s protutijelima – negativna kontola (A), inkubacijom s protutijelom na teški lanac feritina; B-12 (B) i inkubacija s protutijelom na laki lanac feritina; D-1 (C). LLF (C) je pokazao snažniji intenzitet obojenja (crvena fluorescencija) u odnosu na TLF (B), međutim obojenje s obje podjedinice feritina se preklapa (B, C). Za obojenje jezgri (plavo) korištena je boja Hoechst 33342. Veličina jezgri je 5  $\mu\text{m}$ . Mjera 50  $\mu\text{m}$ .

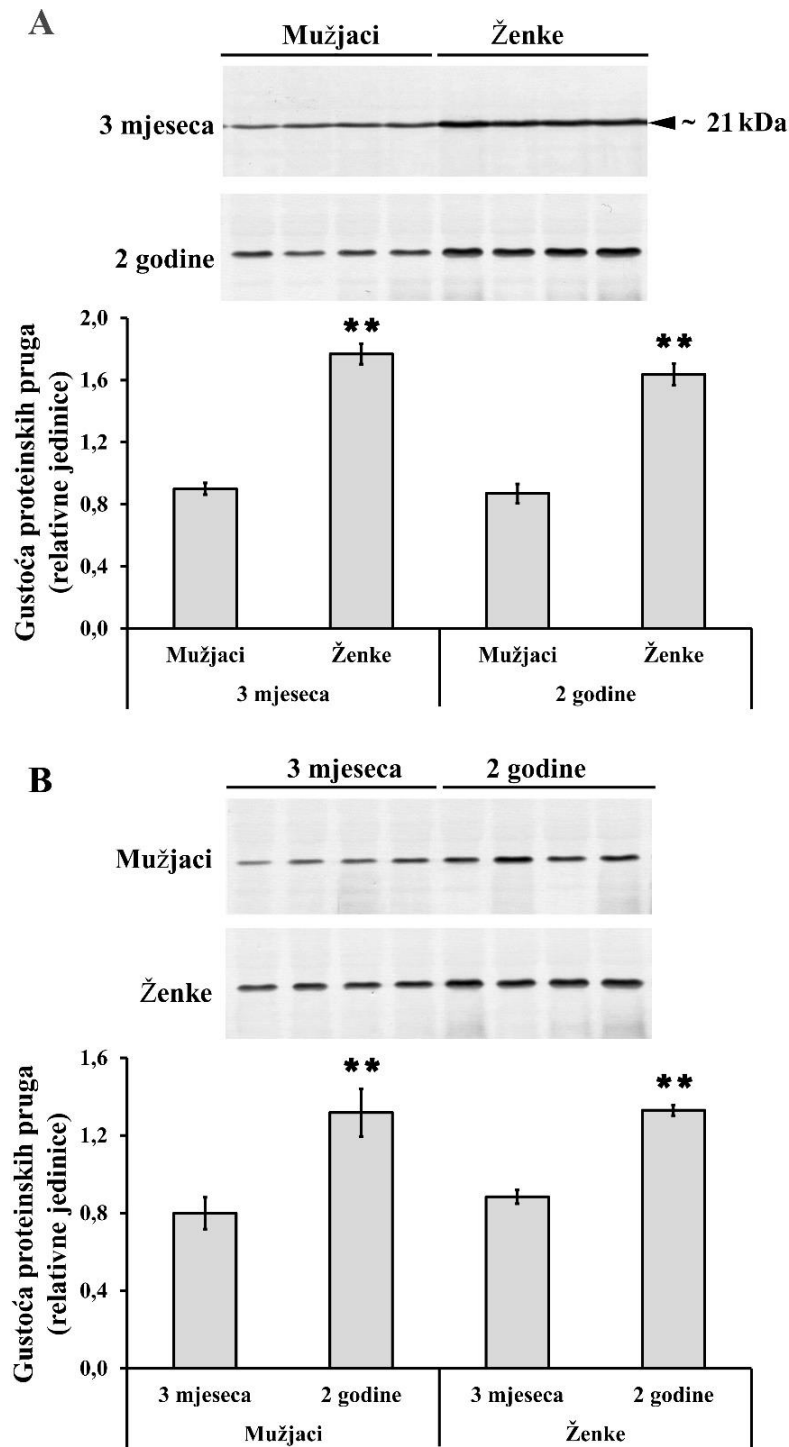


Imunohistokemijski dobivene nalaze o raspodjeli i ekspresiji LLF i TLF u jetri štakora, ovisno o spolu i uzrastu, potvrdili smo i western analizom mjereći, odnosno uspoređujući gustoće dobivenih proteinskih pruga od ~ 20 kDa koje odgovaraju dvjema podjedinicama feritina. Denzitometrijska mjerenja gustoće obojenja proteinskih pruga omogućuju nam procjenu relativnog sadržaja LLF i TLF nakon izvršene western analize. Dobivene proteinske pruge koje odgovaraju LLF, odnosno TLF u jetri odraslih spolno zrelih životinja su jače u ženke nego u mužjaka, dok su u tromjesečnih životinja slabije jačine nego u dvogodišnjih životinja. Iako starenjem količina feritina raste, spolne razlike se zadržavaju. Nadalje, nalazi western analize potvrdili su prisutnost obiju podjedinica feritina u hepatocitima jetre štakora. U nastavku na slikama 20 i 21 slijede statistički značajni rezultati ispitivanja spolnih i starosnih razlika u sadržaju lakog i teškog lanca feritina prikazani western analizom, uz grafički prikaz ovisnosti gustoće proteinske pruge o spolu, odnosno starosti.

Rezultati western blota i denzitometrijske vrijednosti dobivenih proteinskih pruga pokazuju da je sadržaj feritina u homogenatima jetre odraslih štakora 40-50 % veći u ženki nego mužjaka, odnosno da je ekspresija LLF i TLF do 2 puta veća u ženki štakora.

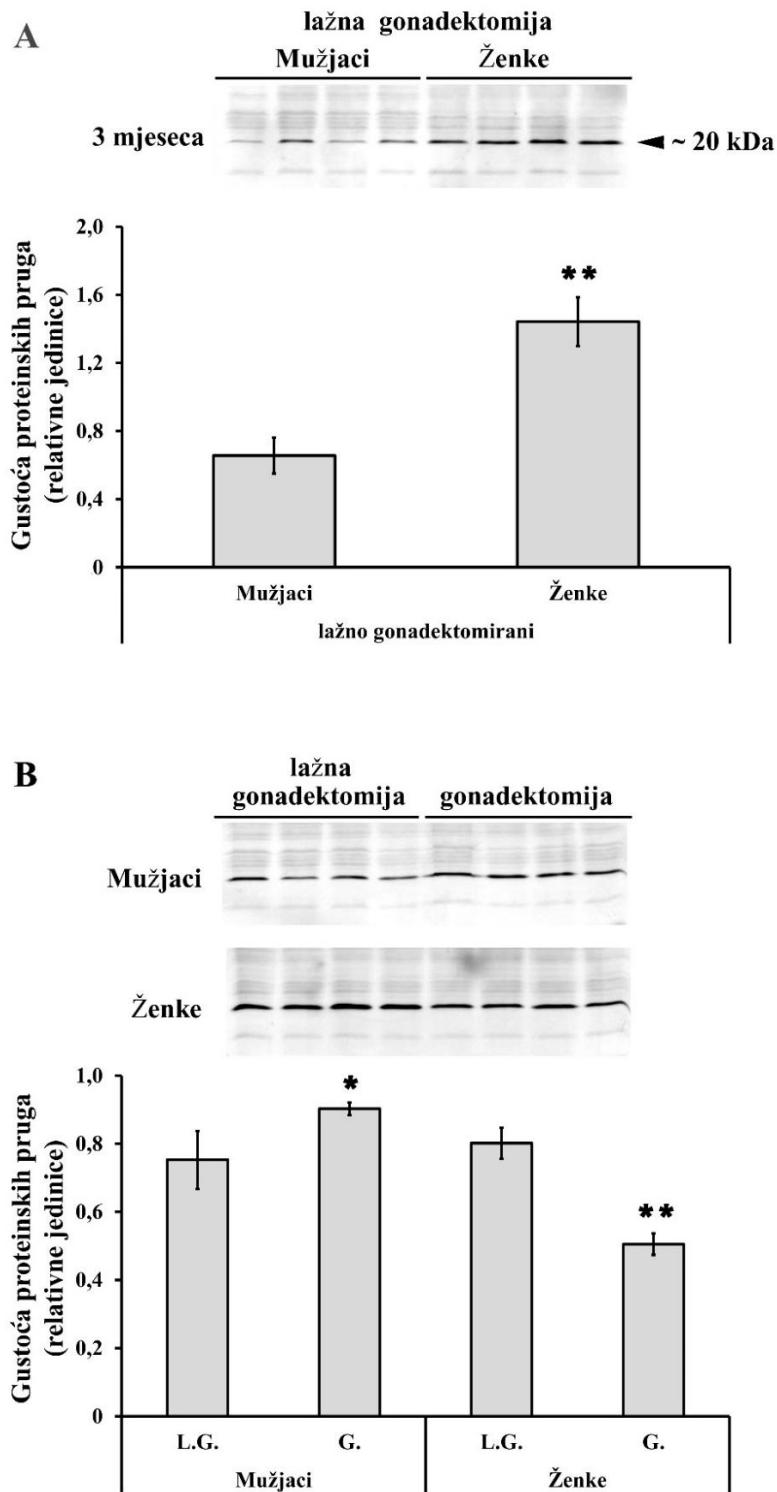


**Slika 20.** Western analiza LLF u homogenatima jetre mužjaka i ženki tromjesečnih i dvogodišnjih štakora te grafički prikaz gustoće dobivenih proteinskih pruga s obzirom na spolne (A) i starosne (B) razlike u ekspresiji, odnosno sadržaju LLF. Gustoća proteinske pruge od 20 kDa je veća u ženki nego u mužjaka te u dvogodišnjih naspram tromjesečnih životinja. Statistička značajnost dobivenih spolnih i starosnih razlika iznosi 99% ( $p < 0,001$ ).

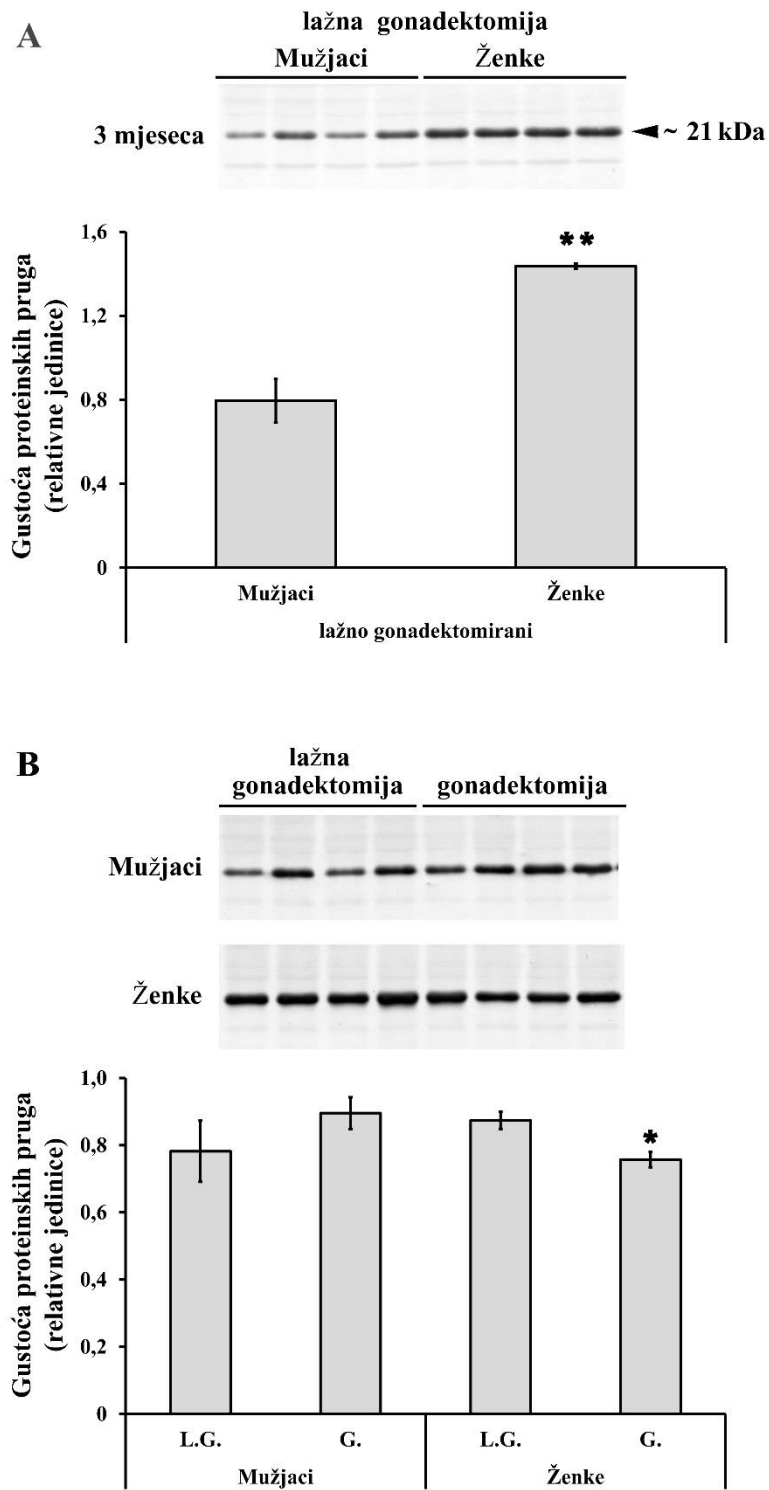


**Slika 21.** Western analiza TLF u homogenatima jetre mužjaka i ženki tromjesečnih i dvogodišnjih štakora te grafički prikaz gustoće dobivenih proteinskih pruga s obzirom na spolne (A) i starosne (B) razlike u ekspresiji, odnosno sadržaju LLF. Gustoća proteinske pruge od 21 kDa je veća u ženki nego u mužjaka te u dvogodišnjih naspram tromjesečnih životinja. Statistička značajnost dobivenih spolnih i starosnih razlika iznosi 99% ( $p < 0,001$ ).





**Slika 22.** Prikaz rezultata western analize dobivenih u lažno gonadektomiranih životinja koje smo koristili kao kontrolnu skupinu (A) i posljedica gonadektomije u odraslih mužjaka i ženki s obzirom na ekspresiju LLF (B). Kastracija mužjaka dovodi do povećanja, dok ovarijska gonadektomija dovodi do smanjenja gustoće proteinske pruge.



**Slika 23.** Prikaz rezultata western analize dobivenih u lažno gonadektomiranih životinja koje smo koristili kao kontrolnu skupinu (A) i posljedica gonadektomije u odraslih mužjaka i ženki s obzirom na ekspresiju TLF (B). Kastracija mužjaka dovodi do blagog, statistički neznačajnog povećanja, dok ovarijskektomija dovodi do smanjenja gustoće proteinske pruge.

## **5. RASPRAVA**

U svrhu razumijevanja molekulske osnove spolnih razlika u nakupljanju željeza prvenstveno u jetri pa i drugim organima, u ovom radu koristili smo specifična protutijela razvijena na humanu sekvencu za praćenje ekspresije teškog (TLF) i lakog lanca (LLF) feritina, dvaju glavnih proteina odgovornih za formiranje feritinskog kompleksa, proteinske kugle odnosno nanokaveza za skladištenje željeza u stanici. U tkivnim naresecima jetre i izoliranim homogenatima iz intaktnih i gonadektomiranih mužjaka i ženki štakora, pratili smo raspodjelu i količinu TLF i LLF na razini proteina imunokemijskim metodama. Glavni nalazi imunokemijskih analiza pokazali su da je u izoliranim homogenatima jetre protutijelo za TLF obilježilo proteinsku prugu od ~ 21 kDa, protutijelo na LLF protein obilježilo je proteinsku prugu na ~ 20 kDa, dok su TLF i LLF bili smješteni u citosolu stanica hepatocita sa jasnom kolokalizacijom obje podjedinice. Nadalje, postojanje spolnih razlika potvrđeno je za ekspresiju TLF i LLF u odraslih štakora u korist ženki, te su nađene jasne starosne razlike u ekspresiji obje podjedinice feritina. Također, kastracija odraslih mužjaka dovela je do povećanja ekspresije proteina obje podjedinice feritina, dok je ovarijektomija u odraslih ženki dovela do smanjenja njihove ekspresije.

Western analizom, protutijelo za LLF je obilježilo proteinsku prugu ~ 20 kDa u uzorcima homogenata izoliranim iz jetre štakora. Međutim, jačina proteinske pruge ovisila je o temperaturi i uvjetima denaturacije; proteinska pruga bila je to slabija što je temperatura denaturacije bila niža te bez prisustva reducirajućeg sredstva  $\beta$ -merkaptoetanol (β-ME), ukazujući na temperaturno osjetljiv feritinski kompleks koji se razdvaja na podjedinice, odnosno lake i teške lance, pri povišenoj temperaturi i u reducirajućim uvjetima. U literaturi navedenoj u prospektu proizvođača, odnosno u prethodnim istraživanjima, proteini LLF i TLF u staničnim kulturama obilježavali su proteinsku prugu od 19-25 kDa (LLF) odnosno 21 kDa (TLF) što se slaže i s našim dobivenim rezultatima gdje je TLF na 21 kDa, dok je nešto niža proteinska pruga LLF na 19-20 kDa (~ 20 kDa) (SantaCruse data sheet sc-390558 (LLF) i sc-376594 (TLF)).

U skladu s očekivanom imunolokalizacijom u štakorskim i humanim hepatocitima, ovim istraživanjem potvrdili smo prisutnost LLF i TLF u citosolu jetrenih stanica. Stanice jetre uz homogenu razinu obojenja naspram negativnoj kontroli (bez protutijela) pokazuju i mozaično pojačano obojenje u nekim stanicama koje imaju povećanu ekspresiju i LLF i TLF. Kako su oba monoklonska protutijela proizvedena u miša, nije bilo moguće provesti jednoznačnu kolokalizaciju na istom uzorku. U tu svrhu smo koristili konsektivne krio



nareske te smo potom potražili i snimili istu regiju koja je jasno pokazala unutarstanično obojenje koje se preklapalo u istim hepatocitima u dva nareška u slijedu. Dobivena raspodjela LLF i TLF u stanicama jetre štakora potpuno odgovara u literaturi opisanoj funkcijskoj ulozi intracelularnog skladištenja željeza feritinskog kompleksa.

Uz esencijalnu metaboličku ulogu u obradi endogenih i egzogenih tvari, funkcija jetre ima i davno ustanovljenu važnost u pohrani glikogena kao metaboličkog goriva, ali i rezerve željeza najvećim dijelom potrebnog za eritropoezu i reproduktivni izazov kod ženki (Meynard i sur, 2014; Kong i sur, 2014). Potonje se čini najvažnijim endogenim čimbenikom, odnosno glavnim uzrokom veoma rano (Widdowson i McCance, 1948) uočenih fizioloških spolnih razlika u nakupljanju željeza. Naime, mužjaci štakora u jetri skladište puno manje željeza nego ženke. Iako rođenjem kreću s iste razine željeza u jetri, ona opada postnatalno u prvih 15 dana da bi zatim počela jednako rasti skoro do drugog mjeseca života. Nakon 60 dana u ženki, vjerojatno pod utjecajem steroidnih hormona tijekom spolnog sazrijevanja, nakupljanje željeza postaje značajno jače nego u mužjaka te za 5 mjeseci dostiže duplo veću razinu koja i dalje raste tijekom starenja te ima približno trostruku razinu naspram mužjaka u sedmom mjesecu života. Poslije dosegnutog pika razina nakupljenog željeza u jetri ženki blago opada do starosti, odnosno do 11 mjeseci koliko je praćeno u navedenom radu. Međutim, izazov graviditeta i laktacije u sedmom mjesecu života ženki rapidno prazni deponij željeza u jetri čak ispod razine u mužjaka, zatim se željezo ponovno rapidno nakuplja u jetri te je do starosti od 11 praćenih mjeseci ponovno nešto više nego u mužjaka iste dobi (Widdowson i McCance, 1948). Rezultati iz navedenog rada dodatno analiziraju utjecaj gonadektomije na nakupljanje željeza pri čemu je zapaženo da kastracija povećava nakupljanje, a slične rezultate daje i obrada kastriranih životinja estrogenom. Nadalje, ovarijektomija ženki smanjuje nakupljanje željeza u jetri, dok obrada ovarijektomiranih ženki estrogenom pojačava nakupljanje, a obrada testosteronom dodatno smanjuje količinu željeza u jetri što je djelomično i potvrđeno nedavnim istraživanjima tromjesečnih životinja (Orct i sur, 2017; Ljubojević i sur, 2019). Autori tih pionirskih radova dodatno potvrđuju postojanje spolnih razlika, osim u jetri, i u bubrezima i slezeni koje se povećavaju starenjem te zadržavaju i nakon tretmana željezom (Widdowson i McCance, 1948, 1953). Dva desetljeća kasnije feritinski kompleks preuzima ulogu glavnog skladišnog proteina željeza 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 (Bjørklid i Helgeland, 1970). Davna potvrda pretpostavki dobivena je radijalnim imunodifuzijskim tehnikama i izolacijom

feritina, proteina otpornog na povišenu temperaturu u uzorcima homogenata izoliranih iz jetre eksperimentalnih životinja, gdje je nađena veća količina proteina feritinskog kompleksa kod ženki u usporedbi sa mužjacima, a koja počinje rasti kod obje skupine tijekom drugog mjeseca života kada se povećava sadržaj feritina i spolne razlike tijekom naredna dva mjeseca koliko je praćenje rađeno (Bjørklid i Helgeland, 1970; Linder i sur., 1973). Novija istraživanja koja bi ekspresiju feritina pratila duže vrijeme te razlučila ekspresiju obje podjedinice feritina specifičnim protutijelima, prema prikupljenim informacijama još nije provedena. Ovim istraživanjem potvrđeni su nalazi spolnih razlika u ekspresiji obje podjedinice feritina već u tromjesečnim životinjama, ali su rezultatima dodani i utjecaj gonadektomije koja očekivano prati ponašanje željeza. Zapaženo je da ekspresija oba lanca feritina kastracijom raste, dok ovarijektomijom pada čime je uniformno potvrđen utjecaj spolnih hormona na sadržaj feritina. Dakle, gonadektomijom se uočava trend smanjenja statističke značajnosti spolnih razlika u ekspresiji obje podjedinice feritina. Nadalje, dodatna informacija proizlazi iz analize utjecaja starenja od dvije godine pri čemu, kao što je i očekivano s obzirom na nakupljanje željeza (Widdowson i McCance, 1948), razina feritina raste u odnosu na tromjesečne životinje, no spolne razlike u ekspresiji oba lanca feritina ostaju očuvane. Navedeni rezultati ukazuju da je nagomilano željezo tijekom starenja uskladišteno u nanokavezima feritina, a vrlo vjerojatno su u zaštiti stanice uključeni i drugi inducibilni zaštitni proteini od metala i ROS kao metalotioneini (Ljubojević i sur, 2019 i neobjavljeni rezultati projekta AGEMETAR). Svi rezultati western analize potvrđeni su i imunohistokemijskim nalazima zamjetno jačeg obojenja LLF i TLF u hepatocitima ženki, nego u mužjaka tromjesečnih i dvogodišnjih eksperimentalnih životinja. Potvrda rezultata spolnih i starosnih razlika ekspresije obje podjedinice feritina novim imunokemijskim metodama bit će temelj za daljnja fiziološka i toksikološka istraživanja (Joshi i Zimmerman, 1988). Međudjelovanja prijelaznih esencijalnih i toksičnih metala, mehanizmi koji štite ili oštećuju stanicu, odnosno organizam te time vrše 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 u skladištenju i metabolizmu.

Značaj istraživanja željeza i njegovih izraženih spolnih razlika širokog je opsega i zadire izvan okvira interesa bazičnih spoznaja. Patologija nasljednih heterokromatoza je neposredan pokazatelj da višak nakupljenog željeza dovodi do poremećaja rada organizma, prvenstveno jetre, ali u tom kontekstu se mora promatrati i nakupljanje željeza starenjem koje može biti u pozadini mnogih bolesti koje se razvijaju u srednjoj i starijoj dobi čovjeka.

Željezo je neophodan element života koji ga ujedno u znatnoj mjeri ugrožava, tako da mora biti pod strogom kontrolom unutar uskih granica (Dlouhy i Outten, 2013). Izuzev toga što je količinski najzastupljeniji prijelazni metal, ono je i neposredno ovisno o cinku i bakru koji su prisutni u znatno manjoj količini, međutim njihova međusobna interakcija je osnova homeostaze većine organizma (Rutherford i Bird, 2003), dok sam proces katabolizma feritina i uskladištenog željeza još uvijek nije potpuno razjašnjen (Bresgen i Eckl, 2015; Muckenthaler i sur., 2017) kao i uloga proteina koji su u međusobnoj interakciji s feritinskim kompleksom (Atrian i Capdevila, 2013). Sve veća pažnja se pridodaje preventivnom djelovanju u svrhu očuvanja čovjekova zdravlja i smanjenja tegoba koje se javljaju starenjem, uz koje se također veže trend porasta nakupljanja željeza. Poznavanje fiziologije na svim razinama od molekularne do sistemske, čini se kao realna baza za preventivno djelovanje na zdravlje. Iako se čini da je dosta informacija već prisutno o bazičnoj fiziologiji čovjeka, podaci ponajprije o spolnim razlikama metala nisu jednoznačni i manjkaju kao osnova objašnjenja mnogih, na populacijskim studijama uočenih razlika između muškaraca i žena u prevalenciji pojedinih bolesti koje se razlikuju s obzirom na spol i uzrast (Harrison-Findik, 2010). Tako i akumulacija željeza u najčešćoj genetskoj bolesti sjeverne Europe i Amerike, nasljednoj heterokromatozi (Gozzelino i Arosio, 2016). Zapažene su dominantno negativne posljedice u muških homozigota sa SNP u HFE genu (Andersen i sur., 2004), osim toga je uočeno da češće oboljevaju muški heterozigoti u odnosu na heterozigote žena. Jednako tako menopauza, odnosno pad razine estrogena i njegovog protektivnog, zaštitnog učinka obilježava granicu do koje su žene zaštićenije od kardiovaskularnih bolesti, nakon toga se izjednačavaju s muškarcima pa čak i poprimaju veći rizik oboljenja od istih (Jian i sur., 2009; Shapiro i sur., 2017). Poneke, pogotovo neurodegenerativne bolesti koje uključuju željezo u patologiji (Uranga i Salvador, 2018) kao primjerice Alzheimerova bolest (Congdon, 2018), ali i reumatoidne bolesti imaju značajnije lošiji tijek u žena nego u muškaraca. Sva navedena stanja imaju kao uzrok ili kao posljedicu povećan oksidativni stres koji može generirati višak željeza ili manjak zaštitnih, odnosno skladišnih proteina. Populacijske studije između roditelja i nerotkinja koje su istraživale mogući utjecaj estrogena kratkoročno ili željeza dugoročno na hormonsku indukciju, odnosno na povećanu izloženost oksidativnom stresu, pokazale su da nerotkinje kratkoročno imaju manju izloženost riziku od malignih oboljenja, ponajprije raka dojke što se pripisuje učinku estrogena, međutim dugoročno imaju veći rizik od malignih oboljenja i kardiovaskularnih događaja od roditelja, osobito višerotkinja, za što se smatra da je odgovoran sadržaj željeza. (Nichols i sur., 2018). Istraživanja i potvrda pretpostavki da nakupljanje željeza predstavlja bazu fiziologije starenja kao i patologije mnogih bolesti, do

nedavno su bila prilično marginalizirana. Noviji značaj prethodno opisanom zasniva se na molekularnoj razini, otkrivanjem regulacije nakupljanja željeza te oštećenja koja izaziva recikliranjem kroz autofagocitozu i feritinofagiju, stoga metabolizam prijelaznih metala počinje dobivati na važnosti (Biasiotto i sur., 2016; Cao i Dixon, 2016; Carmona-Gutierrez i sur., 2016). Esencijalni prijelazni metali, osobito željezo uključeni su u sve stanične procese te ovaj rad potvrđuje da spolne razlike igraju bitnu ulogu u njihovom sadržaju (Oliván i sur., 2014), premda još nema mnogo integriranih istraživanja usredotočenih na povezivanje spolnih razlika, prijelaznih metala i konstitutivnih procesa reciklaže u stanici.

## **6. ZAKLJUČCI**

1) Specifičnost protutijela za LLF i TLF utvrđena je imunokemijskim metodama očekivanim izgledom i veličinom proteinskih pruga kao i raspodjelom u jetri štakora. Jasne uske, neglikozilirane proteinske pruge bile su veličine 20 kDa za LLF i 21 kDa za TLF u reducirajućim uvjetima pri povišenoj temperaturi potrebnim za denaturaciju feritinskog nanokaveza u odvojene podjedinice. Uvjeti ne predstavljaju problem s obzirom da se radi o temperaturno rezistentnim proteinskim molekulama. Obje su podjedinice feritina prema očekivanju izražene i u bubrezima i u jetri te postoje značajne razlike između količine proteina u organima sukladno i količini željeza u njima. Specifična potreba LLF za dodatnim fiksiranjem na PVDF membranu djelovanjem glutaraldehida – svojstvom malih hidrofilnih proteina, moguć je uzrok u literaturi prisutnoj različitoj detekciji pojedinih podjedinica u organima. Imunohistokemijsko obojenje sa LLF i TLF citosola hepatocita jetre odgovara predviđenoj raspodjeli feritina u stanicama.

2) Usporedbom ekspresije LLF i TLF u oba spola štakora *in vivo* dobivene su razlike u korist ženki. Smatra se da je uočena spolna razlika određena pozitivnim učinkom estrogena, i u manjoj mjeri negativnim učinkom testosterona. Rezultat je u skladu sa spolnim razlikama u količini željeza u jetri objavljenom u literaturi.

3) Gonadektomijom mužjaka i ženki, u jetri nađene su promjene u ekspresiji LLF i TLF. Uočen je jasan utjecaj spolnih hormona na razinu feritina. Nakon kastracije nađen je djelomičan porast u odraslih mužjaka, dok je ovarijska gonadektomija odraslih spolno zrelih ženki značajno smanjila ekspresiju praćenih proteina u jetri štakora. Rezultat je također u skladu sa utjecajem gonadektomije na količinu željeza u jetri nedavno objavljenom u literaturi.

4) Stare, dvogodišnje životinje također pokazuju izražene spolne razlike. Usporedno sa odraslim tromjesečnim životinjama, oba spola i obje podjedinice feritina pokazuju značajan porast u ekspresiji kod dvogodišnjih životinja, u skladu sa porastom željeza u jetri objavljenom u literaturi.

5) Rezultati ukazuju da spolne i starosne razlike u ekspresiji obje podjedinice feritina LLF i TLF izražene u jetri u korist ženki, postoje u odraslih životinja i pojačavaju se starenjem. Spolne razlike su određene stimulacijskim utjecajem estrogena i inhibicijskim utjecajem androgena. Starosne razlike su očuvane i porast ekspresije dvogodišnjih naspram tromjesečnih životinja prati nakupljanje željeza u jetri, a uloga spolnih hormona se mora

utvrditi (neobjavljeni rezultati HRZZ projekta AGEMETAR, IP-11-2013-1481). Sukladno nakupljanju željeza u jetri starenjem, očekuje se rast jetrenog hormona hepcidina i pad feroportina, međutim taj dio hipoteze nije obuhvaćen ovim istraživanjem. Svi dobiveni rezultati sukladni su s funkcijom feritinskog kompleksa u skladištenju željeza u jetri štakora i obrani od ROS.

## **7. LITERATURA**



Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York, Garland Science, 2002, str. 1820-1959.

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.

Andrews SC. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800, 691-705.

Arosio P, Carmona F, Gozzelino R, Maccarinelli F, Poli M. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochem J*, 2015, 472, 1-15.

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.

Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33, 457-463.

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.

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

Cleaves HJ, Chalmers JH, Lazcano A, Miller SL, Bada JL. A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres. *Orig Life Evol Biosph*, 2008, 38, 105-115.

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

Dlouhy AC, Outten CE. The Iron Metallome in Eukaryotic Organisms. *Met Ions Life Sci*, 2013, 12, 241–278.

Fleet JC, Andrews GK, McCormick CC. Iron-induced metallothionein in chick liver: a rapid, route-dependent effect independent of zinc status. *J Nutr*, 1990, 120, 1214–1222.

Good M, Vasák M. Iron(II)-substituted metallothionein: evidence for the existence of iron-thiolate clusters. *Biochemistry*, 1986, 25, 8353–8356.

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

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.

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.

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.

Nichols HB, Schoemaker MJ, Cai J, Xu J, Wright LB, Brook MN, Jones ME, Adami HO, Baglietto L, Bertrand KA, Blot WJ, Boutron-Ruault MC, Dorronsoro M, Dossus L, Eliassen

AH, Giles GG, Gram IT, Hankinson SE, Hoffman-Bolton J, Kaaks R, Key TJ, Kitahara CM, Larsson SC, Linet M, Merritt MA, Milne RL, Pala V, Palmer JR, Peeters PH, Riboli E, Sund M, Tamimi RM, Tjønneland A, Trichopoulou A, Ursin G, Vatten L, Visvanathan K, Weiderpass E, Wolk A, Zheng W, Weinberg CR, Swerdlow AJ, Sandler DP. Breast Cancer Risk After Recent Childbirth: A Pooled Analysis of 15 Prospective Studies. *Ann Intern Med*, 2018.

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.

Orihuela R, Fernández B, Palacios O, Valero E, Atrian S, Watt RK, Dominguez-Vera JM, Capdevila M. Ferritin and metallothionein: dangerous liaisons. *Chem Commun*, 2011, 47, 12155-12157.

Pantopoulos K. Inherited Disorders of Iron Overload. *Front Nutr*, 2018, 5, 103.

Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 2012, 51, 5705-5724.

Pead S, Durrant E, Webb B, Larsen C, Heaton D, Johnson J, Watt GD. Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin. *J Inorg Biochem*, 1995, 59, 15-27.

Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 2005, 25, 433-449.

Robertson A, Morrison JN, Wood AM, Bremner I. Effects of iron deficiency on metallothionein-I concentrations in blood and tissues of rats. *J Nutr*, 1989, 119, 439-445.

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

Sánchez M, Sabio L, Gálvez N, Capdevila M, Dominguez-Vera JM. Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life*, 2017, 69, 382-388.

Sangkhav V, Nemeth E. Regulation of the iron homeostatic hormone hepcidin. *Adv Nutr*, 2017, 8, 126-136.

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

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

Theil EC. Ferritin protein nanocages use ion channels, catalytic sites, and nucleation channels to manage iron/oxygen chemistry. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15, 304-311.

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.

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.

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

## SAŽETAK

Kompleksna fiziologija metabolizma željeza ima dugu povijest istraživanja, od feritinskog kompleksa koji spada među najstarije izolirane proteine, do u posljednjih dvadesetak godina nadogradnje u cjelovitu sliku s mnoštvom sudionika čija je uloga još uvijek nedovoljno istražena. Premda feritinski kompleks ulazi u međudjelovanja sa svim prijelaznim metalima, skladištenje željeza u stanici smatra se njegovom glavnom ulogom. Željezo, iako je esencijalni element mora se vrlo precizno kontrolirati kako oslobođeno ne bi izazvalo nastanak reaktivnih kisikovih radikala (*engl.* reactive oxygen species, ROS). Feritinski kompleks od 24 podjedinice u obliku nanokaveza, odnosno proteinske kugle, i proteini koji su s njim u međudjelovanju od iznimne su važnosti u fiziološkim procesima stanica koje koriste željezo. Vrlo ranim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama utvrđene su spolne razlike u količini željeza u jetri i bubrezima u korist ženki, da bi se naknadno povezale sa spolnim razlikama u količini feritina u navedenim organima. Pri tome jetra, odnosno hepatociti, imaju glavnu ulogu u skladištenju željeza u organizmu, dok bubrezi sudjeluju u njegovoj reciklaži.

Primjenom imunokemijskih metoda nove generacije u ovom radu praćene su spolne i starosne razlike u ekspresiji lake i teške podjedinice feritina u jetri tromjesečnih i dvogodišnjih eksperimentalnih životinja. Imunohistokemijski je dobiven uvid u detaljnu raspodjelu feritinskih podjedinica unutar navedenog organa, dok western analizom utvrđene razlike u ekspresiji pojedinih podjedinica. Rezultati imunokemijskih metoda potvrđuju da postoje spolne razlike u obje feritinske podjedinice te da starenjem razlike ostaju prisutne, dok se količina feritina u oba navedena organa povećava ukazujući na povećanu količinu željeza u njima. Obje podjedinice feritina pokazuju vrlo sličnu raspodjelu u jetri koja je najizraženija u hepatocitima oko centralne vene. Zaključeno je da se u jetri eksprimiraju obje podjedinice feritina te uz spolne pokazuju i starosne razlike koje bi mogle biti u korelaciji s povećanom količinom željeza te time s oksidativnim stresom ključnim u patofiziološkim mehanizmima procesa starenja.

## SUMMARY

The complex physiology of iron metabolism has a long history of research, from the ferritin complex, which is among the oldest isolated proteins, to the last twenty years of upgrading to a complete picture with many participants whose role has still not been researched enough. Although ferritin complex interacts with all transition metals, its main purpose is to store iron in a cell. Iron, although the essential element, has to be precisely controlled so that the released does not cause the formation of reactive oxygen radicals (reactive oxygen species, ROS). Ferritin complex consists of 24 subunits forming a nanocage, i.e. protein sphere, and proteins which interact with it are of exceptional value in physiological processes of the cells using iron. Very early research on experimental animals found gender differences in the amount of iron in the liver and kidneys in favor of females, which was later associated to gender differences in the amount of ferritin in these organs. In this case, liver, i.e. hepatocytes, play a major role in storing iron in an organism, while kidneys are involved in its recycling.

By using the new generation immunochemical methods in this work, sex and age differences in the expression of light and heavy subunits of ferritin in the liver of three months old and two years old experimental animals were followed. Detailed distribution of ferritin subunits inside the organ is obtained by immunohistochemistry, while differences in the expression of individual subunits are determined by western analysis. The results of immunochemical methods confirm that there are sex differences in both ferritin subunits and that age differences remain, while the amount of ferritin in both organs increases by indicating an increased amount of iron in them. Both ferritin subunits show a very similar distribution in the liver which is most pronounced in hepatocytes around the central vein. It is concluded that both ferritin subunits are expressed in the liver and show both sex and age differences which may be correlated with an increased amount of iron and thus with oxidative stress, which is crucial to the pathophysiological mechanisms of the aging process.

## POPIS KRATICA

Ab	protutijelo ( <i>engl.</i> antibody)
ARE	promotorska regija ARE ( <i>engl.</i> antioxidant response element)
CA	katalaza ( <i>engl.</i> catalase)
$\beta$ ME	$\beta$ -merkaptoetanol ( <i>engl.</i> $\beta$ -mercaptoethanol)
DcytB	reduktaza ( <i>engl.</i> duodenal cytochrome B)
DMT1	prijenosnik divalentnih metala 1 ( <i>engl.</i> divalent metal transporter 1)
FPN1	feroportin ( <i>engl.</i> solute carrier Slc40a1)
GAMAP	kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno alkalnom fosfatazom ( <i>engl.</i> goat anti mouse alkaline phosphatase)
GAMCY3	kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno fluorescentnom bojom CY3 ( <i>engl.</i> goat anti mouse CY3)
GPX	glutation peroksidaza ( <i>engl.</i> glutathione peroxidase)
GSH	glutation; tripeptidni stanični tiol (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicin)
IRE	element odgovora na željezo ( <i>engl.</i> iron-responsive elements)
IRP	proteini odgovora na željezo ( <i>engl.</i> iron-responsive proteins)
LIP	slobodno željezo ( <i>engl.</i> liable iron pool)
LLF	laki lanac feritina ( <i>engl.</i> ferritin light chain)
MRE	promotorska regija MRE ( <i>engl.</i> metal response element)
MTF1	transkripcijski faktor MTF1 ( <i>engl.</i> metal transcription factor 1)
Nrf2	transkripcijski faktor Nrf2 ( <i>engl.</i> nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
TLF	teški lanac feritina ( <i>engl.</i> ferritin heavy chain)
TFR	transferinski receptor ( <i>engl.</i> transferrin receptor)
TM	prijelazni metali ( <i>engl.</i> transitional metals)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida ( <i>engl.</i> single nucleotid polymorphism)
SOD	superoksidismutaza ( <i>engl.</i> superoxide dismutase)
PCBP	proteini koji isporučuju željezo ( <i>engl.</i> poly-r(C)-binding proteins)
PCD	programirana stanična smrt – apoptoza ( <i>engl.</i> programmed cell death)
RME	receptor posredova endocitoza ( <i>engl.</i> receptor mediated endocytosis)
ROS	reaktivne vrste kisika ( <i>engl.</i> reactive oxygen species ROS)
UTR	netranslantirane regije ( <i>engl.</i> untranslated regions)



**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

### UTVRĐIVANJE SPOLNIH I STAROSNIH RAZLIKA U EKSPRESIJI OBJE PODJEDINICE FERITINA IMUNOKEMIJSKIM METODAMA NOVE GENERACIJE

**Nikolina Antolić**

#### SAŽETAK

Kompleksna fiziologija metabolizma željeza ima dugu povijest istraživanja, od feritinskog kompleksa koji spada među najstarije izolirane proteine, do u posljednjih dvadesetak godina nadogradnje u cjelovitu sliku s mnoštvom sudionika čija je uloga još uvijek nedovoljno istražena. Premda feritinski kompleks ulazi u međudjelovanja sa svim prijelaznim metalima, skladištenje željeza u stanici smatra se njegovom glavnom ulogom. Željezo, iako je esencijalni element mora se vrlo precizno kontrolirati kako oslobođeno ne bi izazvalo nastanak reaktivnih kisikovih radikala (*engl.* reactive oxygen species, ROS). Feritinski kompleks od 24 podjedinice u obliku nanokaveza, odnosno proteinske kugle, i proteini koji su s njim u međudjelovanju od iznimne su važnosti u fiziološkim procesima stanica koje koriste željezo. Vrlo ranim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama utvrđene su spolne razlike u količini željeza u jetri i bubrezima u korist ženki, da bi se naknadno povezale sa spolnim razlikama u količini feritina u navedenim organima. Pri tome jetra, odnosno hepatociti, imaju glavnu ulogu u skladištenju željeza u organizmu, dok bubrezi sudjeluju u njegovoj reciklaži. Primjenom imunokemijskih metoda nove generacije u ovom radu proučene su spolne i starosne razlike u ekspresiji lake i teške podjedinice feritina u jetri tromjesečnih i dvogodišnjih eksperimentalnih životinja. Imunohistokemijski je dobiven uvid u detaljnu raspodjelu feritinskih podjedinica unutar navedenog organa, dok western analizom utvrđene razlike u ekspresiji pojedinih podjedinica. Rezultati imunokemijskih metoda potvrđuju da postoje spolne razlike u obje feritinske podjedinice te da starenjem razlike ostaju prisutne, dok se količina feritina u oba navedena organa povećava ukazujući na povećanu količinu željeza u njima. Obje podjedinice feritina pokazuju vrlo sličnu raspodjelu u jetri koja je najizraženija u hepatocitima oko centralne vene. Zaključeno je da se u jetri eksprimiraju obje podjedinice feritina te uz spolne pokazuju i starosne razlike koje bi mogle biti u korelaciji s povećanom količinom željeza te time s oksidativnim stresom ključnim u patofiziološkim mehanizmima procesa starenja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 23 slike, 1 tablica i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: feritin, hepatociti, imunokemijske metode, spol, starenje, oksidativni stres

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. Živka Juričić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **DETERMINATION OF SEX AND AGE DIFFERENCES IN EXPRESSION OF BOTH FERRITIN SUBUNITS BY THE NEW GENERATION IMMUNOCHEMICAL METHODS**

**Nikolina Antolić**

#### **SUMMARY**

The complex physiology of iron metabolism has a long history of research, from the ferritin complex, which is among the oldest isolated proteins, to the last twenty years of upgrading to a complete picture with many participants whose role has still not been researched enough. Although ferritin complex interacts with all transition metals, its main purpose is to store iron in a cell. Iron, although the essential element, has to be precisely controlled so that the released does not cause the formation of reactive oxygen radicals (reactive oxygen species, ROS). Ferritin complex consists of 24 subunits forming a nanocage, i.e. protein sphere, and proteins which interact with it are of exceptional value in physiological processes of the cells using iron. Very early research on experimental animals found gender differences in the amount of iron in the liver and kidneys in favor of females, which was later associated to gender differences in the amount of ferritin in these organs. In this case, liver, i.e. hepatocytes, play a major role in storing iron in an organism, while kidneys are involved in its recycling. By using the new generation immunochemical methods in this work, sex and age differences in the expression of light and heavy subunits of ferritin in the liver of three months old and two years old experimental animals were followed. Detailed distribution of ferritin subunits inside the organ is obtained by immunohistochemistry, while differences in the expression of individual subunits are determined by western analysis. The results of immunochemical methods confirm that there are sex differences in both ferritin subunits and that age differences remain, while the amount of ferritin in both organs increases by indicating an increased amount of iron in them. Both ferritin subunits show a very similar distribution in the liver which is most pronounced in hepatocytes around the central vein. It is concluded that both ferritin subunits are expressed in the liver and show both sex and age differences which may be correlated with an increased amount of iron and thus with oxidative stress, which is crucial to the pathophysiological mechanisms of the aging process.

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

Thesis includes: 66 pages, 23 figures, 1 table and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ferritin, hepatocytes, immunochemical method, seks, ageing, oxidative stress

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*  
**Živka Juričić, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: May 2019.