

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

MIRKO MAGLICA

**IZRAŽAJ BILJEGA AUTOFAGIJE I APOPTOZE KOD UROĐENIH
ANOMALIJA BUBREGA TIJEKOM FETALNOG I POSTNATALNOG
RAZVOJA U ČOVJEKA I MIŠA**

Doktorski rad

Split, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

MIRKO MAGLICA

**IZRAŽAJ BILJEGA AUTOFAGIJE I APOPTOZE KOD UROĐENIH
ANOMALIJA BUBREGA TIJEKOM FETALNOG I POSTNATALNOG
RAZVOJA U ČOVJEKA I MIŠA**

Doktorski rad

Split, 2025.

Doktorska disertacija izrađena je u sklopu projekata Hrvatske zaklade za znanost: ‘Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta tijekom razvoja u miša i čovjeka’ i ‘Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava (NEPHROGEN)’, kojih je voditeljica prof. dr. sc. Katarina Vukojević.

Objavljeni znanstveni radovi na kojima se temelji ova doktorska disertacija:

1. **Maglica M**, Kelam N, Haque E, Perutina I, Racetin A, Filipović N, Katsuyama Y, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy Markers in Developing and Postnatal Kidneys of Dab1^{-/-}(yotari) Mice. Biomolecules. 2023;13:402. (čimbenik odjeka: 6,064)
2. **Maglica M**, Kelam N, Perutina I, Racetin A, Rizikalo A, Filipović N, Kuzmić Prusac I, Mišković J, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy-Related Proteins in Human Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. Int J Mol Sci. 2024;25:6829. (čimbenik odjeka: 4,9)

Ovaj rad, kao i cijeli svoj osobni i profesionalni put, posvećujem svojim roditeljima, kojima dugujem sve što jesam. Vaša bezuvjetna ljubav, podrška i vjera u mene bili su temelj na kojem sam gradio svaki korak. Najveća mi je želja da budete ponosni na mene — nadam se da sam uspio u tome.

Hvala mojoj tetki, tetku i ostatku rodbine, koji su me kroz sve godine obasipali razumijevanjem i podrškom, a čine to i danas. Mojim sestrama, koje su mi bile izvor snage, motivacije i nježnih riječi podrške — vi ste moj uzor, a ne obrnuto.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorici, profesorici Katarini Vukojević. Hvala vam što ste vjerovali u mene čak i kada sam ja sam sumnjao. Kroz sve izazove i prepreke koje smo zajedno savladali tijekom ove disertacije, niste mi dopuštali da odustanem — na tome vam beskrajno hvala. Hvala i svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju na pruženoj pomoći i savjetima.

Hvala i mojim dragim kolegama iz Doma zdravlja Livno, Županijske bolnice Livno i KBC-a Split na razumijevanju, strpljenju i podršci. Svako propušteno druženje bilo je žrtva ovog puta — nadoknadit ćemo!

I na kraju, hvala dragom Bogu, mojim djedovima i bakama, svim malim i velikim lavovima iz Klaićeve koji me, vjerujem, gledaju i čuvaju s visina. Vaša prisutnost u mom srcu nikada ne blijedi.

Fil 4:13

-Mirko

Sadržaj

POPIS KRATICA I OZNAKA	1
1. UVOD.....	5
1.1. Razvoj mokraćnog sustava	6
1.1.1. Pronefros	7
1.1.2. Mezonefros.....	8
1.1.3. Metanefros.....	8
1.2. Anatomija i histologija odraslog bubrega čovjeka	10
1.2.1. Anatomija i topografija	10
1.2.2. Histologija	11
1.3. Anatomija i histologija odraslog mišjeg bubrega	17
1.4. Fiziologija bubrega	18
1.5. Prirođene anomalije bubrega i mokraćnih puteva (CAKUT)	19
1.5.1. Dijagnostičke mogućnosti prirođenih anomalija mokraćnog sustava.....	22
1.5.2. Terapijske mogućnosti prirođenih anomalija mokraćnog sustava	23
1.6. Značaj animalnih modela u istraživanjima bolesti bubrega.....	24
1.7. <i>Yotari</i> miš.....	25
1.8. Autofagija i apoptoza u bolestim bubrega	26
2. CILJEVI I HIPOTEZE	30
2.1. Ciljevi istraživanja	31
2.2. Hipoteza istraživanja.....	31
3. MATERIJALI I METODE.....	33
3.1. Etička dozvola.....	34
3.2. Prikupljanje uzoraka	34
3.2.1. Prikupljanje animalnih uzoraka.....	34
3.2.2 Prikupljanje humanih uzoraka.....	35

3.3. Postupci obrade uzoraka	37
3.3.1. Uspostavljanje kolonije DAB1 knock-out (<i>yotari</i>) miševa i prikupljanje uzoraka	37
3.3.2. Priprema tkiva bubrega za histološku analizu:.....	37
3.3.3. Hematoksilin-eozin bojanje	38
3.3.4. Imunofluorescejinsko bojanje	38
3.3.5. Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju.....	39
3.3.6. Prikupljanje podataka i obrada mikrofotografija	39
3.2.1. Statistički postupci.....	41
4. REZULTATI	42
4.1. Rezultati studije na životinjskim uzorcima.....	43
4.1.1. Izražaj LC3B u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	43
4.1.2. Izražaj GRP78 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	49
4.1.3. Izražaj HSC70 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	54
4.1.4. Izražaj LAMP2A u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	58
4.1.5. Izražaj A11 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	63
4.1.6. Izražaj AIF u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	67
4.2. Rezultati studije na humanim uzorcima.....	71
4.2.1. Izražaj LC3B u fetalnim humanim bubrezima	71
4.2.2. Izražaj GRP78 u fetalnim humanim bubrezima	74
4.2.3. Izražaj HSP70 u fetalnim humanim bubrezima	77
4.2.4. Izražaj LAMP2A u fetalnim humanim bubrezima.....	80

5. RASPRAVA.....	84
5.1. Izražaj LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A, A11 i AIF u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa	85
5.2. Izražaj LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A u fetalnim humanim bubrezima...	89
6. ZAKLJUČAK.....	93
7. SAŽETAK.....	97
8. LAIČKI SAŽETAK	99
9. SUMMARY	101
10. LAY SUMMARY	103
11. LITERATURA	105
12. KRATKI ŽIVOTOPIS	116

POPIS KRATICA I OZNAKA

ACE – angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme*)

ADH – antidiuretski hormon (engl. *antidiuretic hormone*)

AIF – faktor induciran apoptozom (engl. *apoptosis-inducing factor*)

A11 – protein sličan transporteru natrijevog bikarbonata 11 (engl. *solute carrier family 4 member 11*)

AKI – akutno bubrežno oštećenje (engl. *acute kidney injury*)

APKD – autosomno dominantna policistična bolest bubrega (engl. *autosomal dominant polycystic kidney disease*)

BM – glomerularna bazalna membrana (engl. *glomerular basement membrane*)

CAKUT – prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (engl. *congenital anomalies of the kidney and urinary tract*)

Cd – sabirna cjev (engl. *collecting duct*)

CKD – kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*)

CNV – varijacije broja kopija (engl. *copy number variations*)

CTRL – zdrava kontrola (engl. *control kidneys*)

Ct – zavijeni kanalići (engl. *convoluted tubules*)

DAB1 – Disabled-1 protein

DAPI – boja za bojanje jezgri (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DCT – distalni zavijeni kanalić (engl. *distal convoluted tubule*)

DU – bubreg s dvostrukim ureterom (engl. *duplex kidney*)

DYS – displastični bubreg (engl. *dysplastic kidney*)

E – embrionalni dan

GA – glutaraldehid

G – glomerul (engl. *glomerulus*)

GRP78 – glukoza regulirani protein 78 (engl. *glucose-regulated protein 78*)

HE – hematoksin eozin

HK – potkovasti bubreg (engl. *horseshoe kidney*)

HSP70 – protein toplotnog šoka 70 (engl. *heat shock protein 70*)

HYP – hipoplastični bubreg (engl. *hypoplastic kidney*)

iPSC – inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *induced pluripotent stem cells*)

IMS – infekcije mokraćnog sustava

JGA – jukstaglomerularni aparat (engl. *juxtaglomerular apparatus*)

Jr – jukstamedularna regija (engl. *juxtamedullary region*)

LAMP2A – lizosomu pridruženi membranski protein tip 2A (engl. *lysosome-associated membrane protein type 2A*)

LC3B – mikrotubulima pridruženi protein 1A/1B-lagani lanac 3B (engl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3B*)

MCD – bolest minimalnih promjena (engl. *minimal change disease*)

Mm – metanefrogeni mezoderm (engl. *metanephric mesenchyme*)

MRI – magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance imaging*)

NaCl – natrijev klorid

NGS – nova generacija sekvencioniranja (engl. *next-generation sequencing*)

Nz – nefrogena zona (engl. *nephrogenic zone*)

P – postnatalni dan (engl. *postnatal day*)

PAP – peroksidaza-antiperoksidaza (engl. *peroxidase anti-peroxidase*)

PBS – fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCT – proksimalni zavijeni kanalić (engl. *proximal convoluted tubule*)

PERK – protein kinaza nalik na ER kinazu (engl. *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldehid (engl. *paraformaldehyde*)

PO – podociti (engl. *podocytes*)

PUV – posteriorni uretralni zalisci (engl. *posterior urethral valves*)

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (engl. *renin-angiotensin-aldosterone system*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

Rv – bubrežni mjehurići (engl. *renal vesicles*)

UPJO – opstrukcija ureteropelvičnog spoja (engl. *ureteropelvic junction obstruction*)

UR – mokraćni prostor (engl. *urinary space*)

UVJO – opstrukcija ureterovezikalnog spoja (engl. *ureterovesical junction obstruction*)

VUR – vezikoureteralni refluks (engl. *vesicoureteral reflux*)

Wt – divlji tip (engl. *wild type*)

WES – cijeloegzomsko sekvencioniranje (engl. *whole exome sequencing*)

WGS – cijelogenomsko sekvencioniranje (engl. *whole genome sequencing*)

1. UVOD

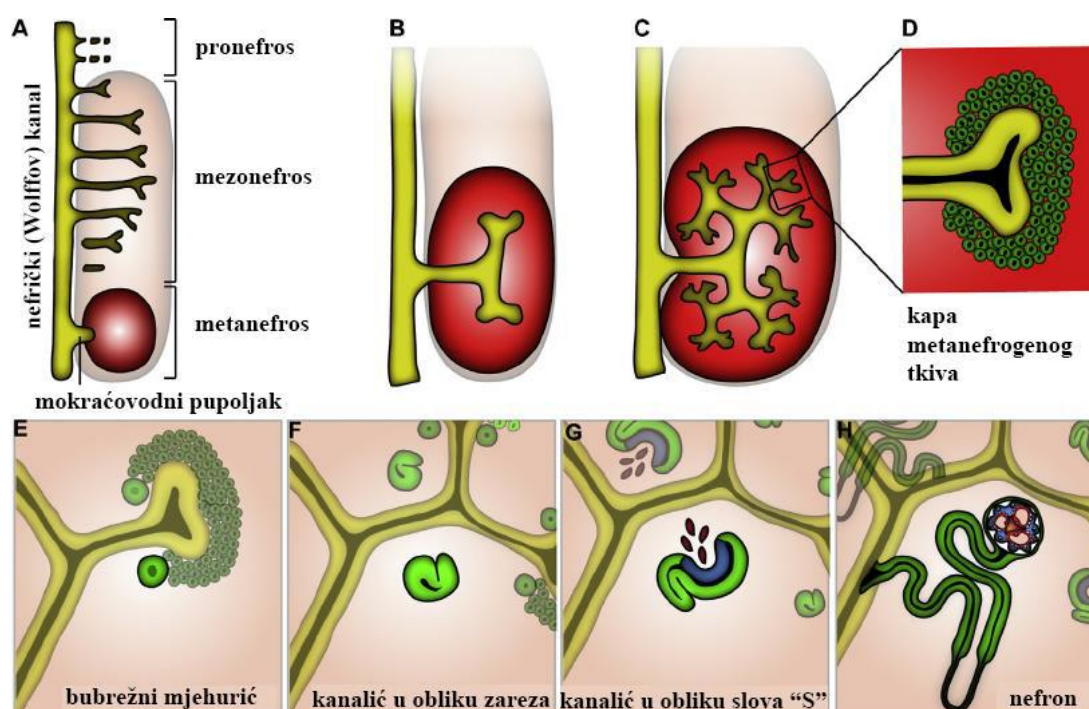
U uvodu je dan sažet prikaz i usporedba razvoja mokraćnog sustava čovjeka i miša, s posebnim naglaskom na patogenetske mehanizme te patohistološke značajke kongenitalnih anomalija mokraćnog sustava (CAKUT). Nadalje, razmatra se povezanost procesa autofagije i apoptoze s razvojem navedenih anomalija. Također, ukratko je opisana važnost animalnih modela, s posebnim osvrtom na fenotip *yotari* miša (*Dab1*^{-/-}).

1.1. Razvoj mokraćnog sustava

Razvoj većine organskih sustava, pa tako i mokraćnog okarakteriziran je postojanom ravnotežom između preživljavanja stanica i programirane stanične smrti (apoptoze). Iako je navedena ravnoteža dobro shvaćena i opisana za razvoj udova, centralnog i perifernog živčanog, gastrointestinalnog i drugih sustava, njezin utjecaj u nefrogenezi i razvoju ostalih dijelova urotrakta tek treba biti razjašnjen (1). Prema dosadašnjim shvaćanjima signalni putevi zaslužni za preživljavanje stanice su ključni za održavanje metanefričkog mezenhima omogućavajući neometani proces nefrogeneze. S druge strane, lokalizirani "otočići" apoptoze posredovani različitim efektorskim kaspazama omogućavaju postizanje adekvatne morfogeneze bubrega i urotrakta. Također, aktivacija intrinzičnih apoptotičkih puteva je važna za održavanje grananja mokraćovodnog pupoljka, nefrogeneze i povezivanja uretera s mokraćnim mjehurom (2, 3). Funkcionalno gledano, u odraslog čovjeka urogenitalni se sustav dijeli na dva zasebna dijela: mokraćni i genitalni sustav. Ipak, tijekom embrionalnog razvoja ta su dva dijela nerazdvojivo povezana te se oba razvijaju iz intermedijarnog mezoderma, smještenog uz stražnji zid abdominalne šupljine. U toj fazi razvoja, odvodni kanalići oba sustava ulijevaju se u zajedničku šupljinu — kloaku (4). Tijekom intrauterinog razvoja bubrega formiraju se tri međusobno preklapajuća sustava, i to u kraniokaudalnom slijedu: pronefros, mezonefros i metanefros. Prvi od njih, pronefros, iako rudimentaran i funkcionalno beznačajan, ima važnu ulogu u inicijaciji razvoja i sazrijevanju konačnog bubrega. Mezonefros, koji se razvija odmah nakon pronefrosa, ima ograničenu funkciju stvaranja urina tijekom prvih dana svojeg postojanja. Konačno, metanefros se tijekom vremena razvija u trajni, funkcionalni bubreg čovjeka (4, 5). Iako se razvoj bubrega u ljudi i miševa odvija prema istom morfogenetskom obrascu, postoje razlike u vremenskoj dinamici pojave i regresije prijelaznih stadija zbog različitog trajanja gestacije — koja u čovjeka prosječno traje 40 tjedana, a u miša svega 20 dana (6). U sljedećih nekoliko odlomaka bit će opisan složeni, više-fazni mehanizam razvoja svih dijelova mokraćnog sustava.

1.1.1. Pronefros

Pronefrički bubreg predstavlja najraniji stadij razvoja mokraćnog sustava i odlikuje se relativno jednostavnom građom. Sastoji se od 7 do 10 staničnih nakupina smještenih u cervikalnoj regiji zametka (Slika 1A). U čovjeka se pronefros počinje razvijati početkom četvrtog tjedna gestacije (E20–E22), dok se kod miša javlja već osmog dana nakon oplodnje (E8). Ove stanične nakupine, koje čine pronefros, predstavljaju segmentirane dijelove intermedijarnog mezoderma poznate kao nefrotomi, koji formiraju početne tubule mokraćnog sustava. Kranijalno smješteni nefrotomi postupno regrediraju prije nego što se razviju oni kaudalniji. Tijekom ovog stadija nefrogeneze formira se između 6 i 10 parova nefrotoma, a svaki od njih sadrži šupljinu nazvanu nefrocel (7). Ovi se tubuli spajaju i povezuju u pronefrički kanal, koji se proteže od cervikalne regije (kranijalna granica) do kloake (kaudalna granica) embrija. Unutar tubula, stanice s trepetljikama potiču protok tekućine, koja se djelomično resorbira u okolne krvne sinuse. Dok ovaj rani ekskrecijski sustav ima funkcionalnu ulogu u nekim nižim kralježnjacima, poput riba, kod čovjeka je nefunkcionalan i potpuno regredira do kraja četvrtog tjedna gestacije (E25), odnosno oko devetog dana razvoja kod miša (E9) (4, 8, 9).



Slika 1. Razvojni stadiji ljudskog bubrega. Preuzeto i prilagođeno prema: Schell C, Wanner N, Huber TB. Glomerular development – Shaping the multicellular filtration unit. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;36:39–49. Licenca broj: 6058890045038. Dozvola za korištenje dodijeljena od strane Elseviera i Copyright Clearance Centera (10).

1.1.2. Mezonefros

Razvoj mezonefrosa (Slika 1A) započinje usporedno s regresijom pronefrosa, tijekom 4. gestacijskog tjedna u ljudskom embriju (11) i E9 u miša (12). Mezonefros i mezonefrički (Wolffov) kanal razvijaju se iz intermedijarnog mezoderma, u području između gornjih torakalnih i gornjih lumbalnih segmenata zametka. Početkom četvrtog tjedna embrionalnog razvoja, paralelno s regresijom pronefričkog sustava, započinje formiranje prvih mezonefričkih kanalića. Ti se kanalići relativno brzo izdužuju te poprimaju oblik slova S, pri čemu dolazi do nakupljanja kapilara u njihovom medijalnom dijelu. Te kapilarne nakupine kasnije će formirati glomerule (Slika 1E) (4). Oko glomerula, tubuli oblikuju Bowmanovu čahuru, čime se formira primitivno bubrežno tjelešce. S lateralne strane, svaki od tih tubula ulazi u longitudinalni sabirni kanal poznat kao mezonefrički ili Wolffov kanal (13). U čovjeka, kranijalno smješteni nefroni postupno atrofiraju i degeneriraju, slijedeći razvojni val koji se kreće od kranijalnog prema kaudalnom dijelu. Kanalići kaudalno smještenih nefrona ne uspostavljaju vezu s Wolffovim kanalom, zbog čega nikada ne postaju funkcionalni (14). Mezonefros u čovjeka postupno regredira do kraja trećeg mjeseca intrauterinog razvoja (15), dok kod miša ovaj proces završava oko 14. dana embrionalnog razvoja (E14) (16). U muškaraca, nekoliko kaudalno smještenih mezonefričkih tubula, zajedno s mezonefričkim (Wolffovim) kanalom, perzistira te sudjeluje u formiranju izvodnih kanala testisa. Nasuprot tome, u žena ti strukturalni elementi u potpunosti nestaju. Na kaudalnom kraju Wolffovog kanala formira se mokraćovodni pupoljak, označavajući početak razvoja metanefrosa (4).

1.1.3. Metanefros

Treći razvojni stadij mokraćnog sustava predstavlja trajni bubreg, odnosno metanefros. Kod čovjeka se pojavljuje u petom tjednu gestacije, dok kod miša nastaje oko 11. dana embrionalnog razvoja (E11–E11.5). Njegova odvodna komponenta razvija se iz metanefričkog mezenhima na sličan način kao u prethodnom stadiju — mezonefrosu. Ipak, razvoj tubularnog sustava u metanefrosu znatno se razlikuje od ranijih, jednostavnijih oblika te uključuje složenije procese grananja i diferencijacije (4, 17).

1.1.3.1. Sabirni sustav

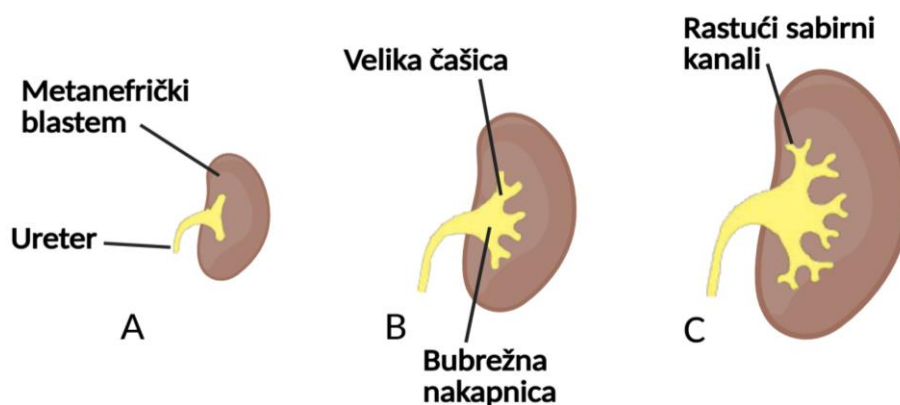
Sabirni kanali metanefrosa razvijaju se iz mokraćovodnog pupoljka, koji predstavlja izdanak mezonefričkog (Wolffovog) kanala u neposrednoj blizini ulaza u kloaku. Pupoljak prodire u mezenhim metanefričkog blastema, koji ga obavija poput kape. Kao rezultat ove

interakcije, mokraćovodni pupoljak se dilatira i formira primitivnu bubrežnu zdjelicu (lat. *pyelon*), te se potom dijeli u kranijalni i kaudalni segment — preteče budućih bubrežnih čašica (Slika 1C) (18). Epitelne stanice vršaka sabirnih kanalića (lat. *ampullae*) potiču zgrušavanje stanica metanefričkog mezoderma (Slika 1D) koje stvaraju kape metanefrogenog tkiva čime započinje proces nefrogeneze (19).

Svaka bubrežna čašica (lat. *calyx renalis*) formira dva nova pupoljka tijekom prodiranja kroz metanefričko tkivo. Ovi se pupoljci dalje dijele, sve dok 12 ili više generacija tubula ne bude formirano. Periferno se stvaraju novi tubuli sve do kraja petog mjeseca gestacije. Tubuli drugog reda se uvećavaju i apsorbiraju tubule treće i četvrte generacije, formirajući na taj način male bubrežne čašice. Tubuli pete i kasnijih generacija se elongiraju, te konvergiraju prema malim bubrežnim čašicama, stvarajući bubrežne piramide (lat. *pyramis renalis*) (Slika 2) (4).

1.1.3.2. Odvodni sustav

Svaki novoformirani sabirni kanal na svom distalnom kraju biva prekriven metanefričkom kapom, koju čine stanice metanefričkog mezenhima (20). Pod inducirajućim utjecajem sabirnih tubula, ove stanice se organiziraju u male vezikule poznate kao bubrežna tjelešca, koja zauzvrat potiču daljnji razvoj sabirnih kanalića u obliku slova S (Slika 1E). U džepove krajnjih dijelova „S” tubula urastaju kapilare koje se diferenciraju u glomerule. Navedeni tubuli zajedno s glomerulima tvore nefrone, osnovne ekskrecijske jedinice bubrega. Proksimalni dio svakog nefrona čini Bowmanova čahura, dok distalni segment uspostavlja izravnu vezu sa sabirnim tubulom, stvarajući tako kontinuitet od čahure do sabirnog sustava. Daljnji rast odvodnog tubula dovodi do formiranja proksimalnog zavijenog kanalića (engl. *proximal convoluted tubule* – PCT), Henleove petlje (engl. *loop of Henle* – HL) i distalnog zavijenog kanalića (engl. *distal convoluted tubule* – DCT). Zaključno, mokraćovodni pupoljak predstavlja osnovu za razvoj sabirnog sustava bubrega, uključujući ureter, bubrežnu zdjelicu, čašice, sabirne kanale i kanaliće. S druge strane, metanefrogeni mezenhim diferencira se u glomerule, tubularne segmente nefrona i intersticijsko (stromalno) tkivo (21, 22).



Slika 2. Razvoj sabirnih kanalića. Slika je izrađena u Biorender softveru.

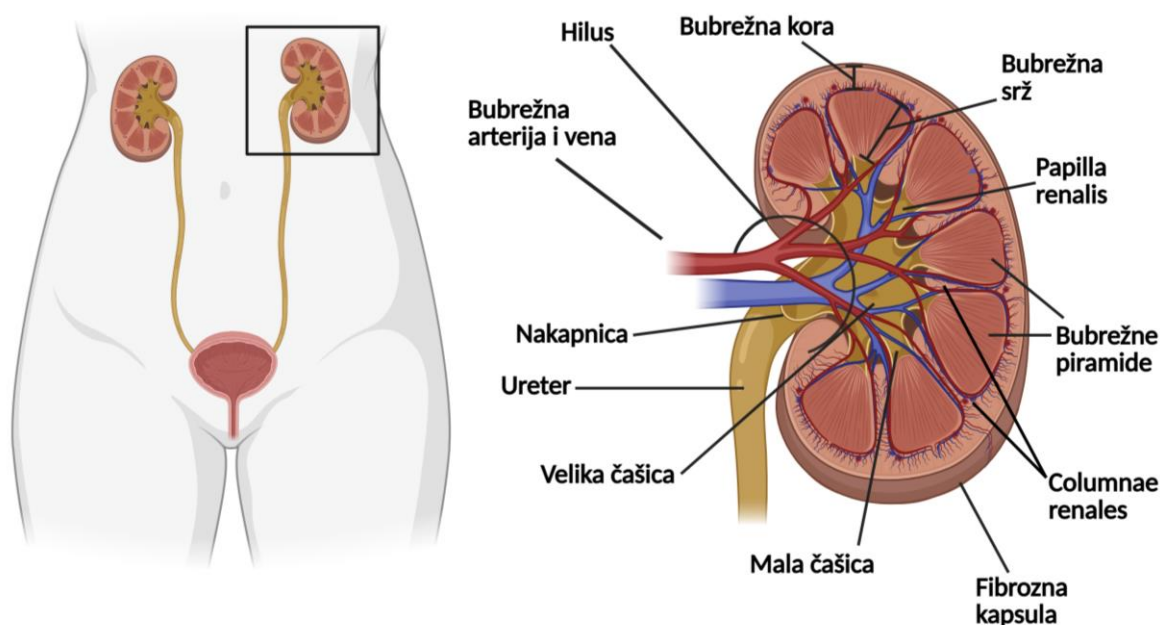
1.2. Anatomija i histologija odraslog bubrega čovjeka

1.2.1. Anatomija i topografija

Odrasli bubrezi su parni, oblikom grahu slični organi smješteni retroperitonealno u stražnjem dijelu trbušne šupljine, s obje strane kralježnice. Desni bubrežni organ obično se nalazi nešto niže od lijevog zbog prisutnosti jetre. Prosječne dimenzije bubrega kod odraslih osoba su 10–12 cm u duljinu, 5–7 cm u širinu i 2–3 cm u debljinu, s težinom od oko 150 g kod muškaraca i 135 g kod žena. Topografski, gornji pol desnog bubrega proteže se od sredine desetog torakalnog do sredine prvog lumbalnog kralješka, dok se donji pol nalazi između drugog i trećeg lumbalnog kralješka. Lijevi bubrežni organ smješten je nešto više, s gornjim polom između devetog torakalnog i dvanaestog torakalnog kralješka, a donjim polom između drugog i trećeg lumbalnog kralješka (23, 24). Svaki bubrežni organ ima dvije površine (prednju i stražnju), dva ruba (lateralni i medijalni) te dva pola (gornji i donji). Na medijalnom rubu nalazi se hilus bubrega, kroz koji ulaze bubrežna arterija i živci, a izlaze bubrežna vena, limfne žile i ureter. Hilus vodi u bubrežni sinus, šupljinu ispunjenu masnim tkivom koja sadrži bubrežnu zdjelicu, velike i male čašice te krvne i limfne žile (23). Parenhimski dio bubrega sastoji se od kore (lat. *cortex renalis*) i srži (lat. *medulla renalis*). Kora bubrega obuhvaća vanjski sloj i proteže se između bubrežnih piramida kao stupci (lat. *columnae renales*). Srž se sastoji od 8 do 18 konusnih

bubrežnih piramida, čiji se vrhovi (lat. *papillae renales*) otvaraju u male čašice, koje se spajaju u velike čašice, a zatim u bubrežnu zdjelicu, koja se nastavlja u ureter (Slika 3) (25, 26).

Bubrezi su bogato vaskularizirani organi. Bubrežna arterija (lat. *arteria renalis*), grana abdominalne aorte, ulazi u bubrežni hilus i dijeli se na segmentalne arterije, koje se dalje granaju u interlobarne, arkuatne i interlobularne arterije, opskrbljujući nefrone krvlju. Venska krv odvodi se putem bubrežne vene (lat. *vena renalis*) u donju šuplju venu (lat. *vena cava inferior*) (27). Bubrezi su smješteni retroperitonealno, okruženi masnim tkivom (lat. *capsula adiposa*) i bubrežnom fascijom (lat. *fascia renalis*), što im pruža mehaničku zaštitu i fiksaciju unutar trbušne šupljine. Ova anatomska pozicija omogućuje relativnu pokretljivost bubrega tijekom disanja i promjena položaja tijela (8, 23).

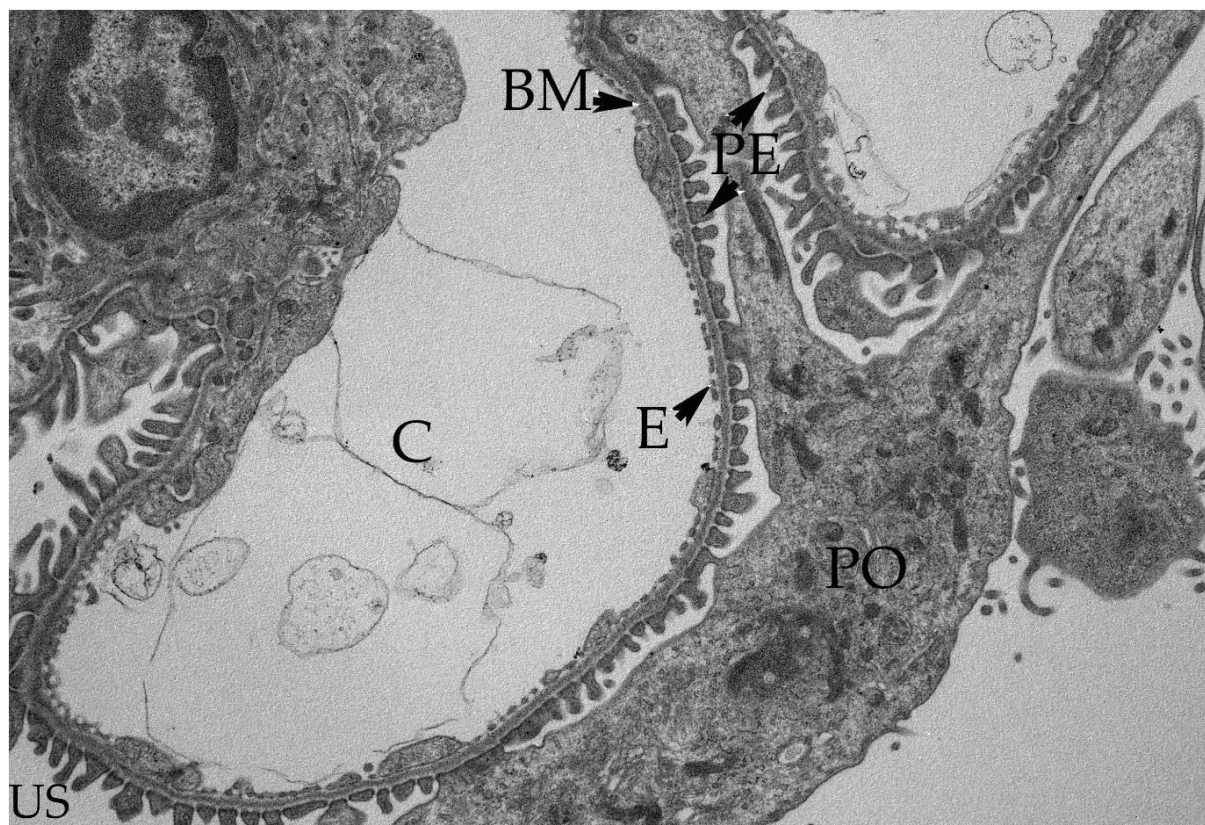


Slika 3. Anatomija i topografija bubrega. Slika je izrađena u Biorender softveru.

1.2.2. Histologija

Svaki bubrežni sadrži između 1 i 4 milijuna nefrona (grč. nephros – bubrežni), koji predstavljaju osnovne funkcionalne jedinice bubrežnog tkiva. Nefron se sastoji od bubrežnog (Malpighijevog) tjelešca, proksimalnog zavijenog kanalića, tankog i debelog dijela Henleove petlje te distalnog zavijenog kanalića. Iako sudjeluju u transportu urina, sabirni kanali i kanalići strukturno i funkcionalno se ne ubrajaju u sastavne dijelove nefrona (28).

Svako bubrežno tjelešće promjera je otprilike 200 μm i sastoji se od klupka krvnih kapilara – glomerula – okruženog dvoslojnom epitelnom kapsulom poznatom kao glomerularna (Bowmanova) kapsula. Unutarnji, odnosno visceralni list kapsule usko prianja uz kapilare glomerula, dok vanjski, parijetalni list formira vanjsku granicu bubrežnog tjelešća. Između ova dva sloja nalazi se mokraćni prostor u koji se, kroz stijenku kapilara i visceralni list, filtrira krvna plazma. Bubrežno tjelešće ima dva jasno definirana pola: vaskularni pol, kroz koji aferentna arteriola ulazi, a eferentna arteriola izlazi iz glomerula, te mokraćni pol, iz kojeg započinje PCT. Nakon ulaska u glomerul, aferentna arteriola se grana u dva do pet primarnih ogranaka, od kojih svaki formira mrežu kapilara koje zajedno čine glomerularni splet (28, 29). Stanice unutrašnjeg sloja Bowmanove kapsule nazivaju se podociti i imaju tijelo od kojeg polazi nekoliko primarnih produžetaka. Svaki primarni produžetak daje brojne sekundarne produžetke, tzv. nožice, koje obavijaju glomerularne kapilare (28). Između fenestriranih endotelnih stanica glomerularnih kapilara i podocita koji oblažu njihovu vanjsku površinu nalazi se zajednička bazalna membrana. Ta membrana predstavlja glavnu filtracijsku barijeru između krvi i mokraćnog prostora. Nastaje spajanjem bazalnih lamina endotelnih stanica i podocita (Slika 4). Elektronskim mikroskopom prepoznaju se tri sloja bazalne membrane: središnji elektronski gust sloj – lamina densa – te dva elektronski svjetlija sloja sa svake strane – lamina rara interna i lamina rara externa (30). Lamina densa sastavljena je od mreže kolagena tipa IV i laminina, uz dodatak matriksa bogatog proteoglikanima s negativnim nabojem, poput heparan sulfata, koji ograničavaju prolaz kationa i velikih molekula. Na taj način, glomerularna bazalna membrana djeluje kao selektivna makromolekularna barijera, pri čemu lamina densa ima primarnu ulogu fizičkog filtra (28).

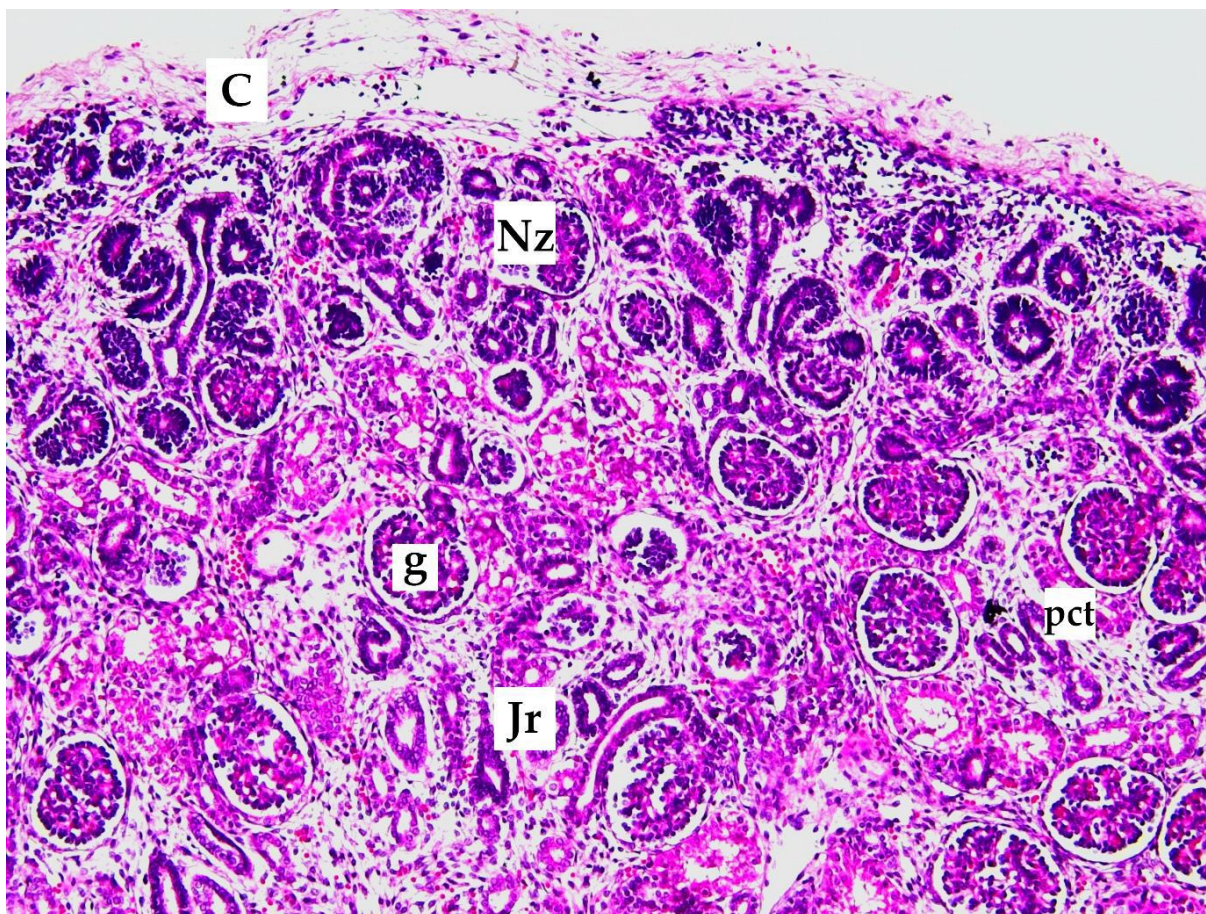


Slika 4. Prikaz filtracijske barijere glomerula snimljen transmisijskim elektronskim mikroskopom. Filtracijska barijera sastoji se od fenestriranog endotela (E), kapilare (C) i glomerularne bazalne membrane (BM) koja dijeli vaskularni od mokraćnog prostora (US), te sekundarnih izdanaka (PE) i podocita (PO) između kojih se protežu filtracijske pukotine. Fotografija je izvorno snimljena na arhiviranom preparatu ljudskog bubrega u 14. danu postnatalnog razvoja. Slika je snimljena pri povećanju $\times 15.000$. Transmisijski elektronski mikroskop (JEM JEOL 1400, Japan).

U odraslih osoba, protok krvi kroz oba bubrega iznosi između 1,2 i 1,3 litara u minuti, što znači da cijeli volumen cirkulirajuće krvi prođe kroz bubrege svakih 4 do 5 minuta. Glomeruli su sastavljeni od arterijskih kapilara u kojima je hidrostatski tlak relativno visok, približno 45 mmHg, što je značajno više nego u većini drugih kapilarnih mreža u tijelu. Glomerularni filtrat po svom kemijskom sastavu vrlo je sličan krvnoj plazmi, no gotovo je u potpunosti lišen proteina, budući da makromolekule teško prolaze kroz slojeve glomerularnog filtra. Najveće proteinske molekule koje uspijevaju proći imaju molekularnu masu oko 70 kDa, zbog čega se u filtratu mogu pronaći samo male količine albumina plazme (31).

PCT obložen je kubičnim ili cilindričnim epitelom. Stanice ovog epitela imaju acidofilnu citoplazmu jer sadrže brojne izdužene mitohondrije (32). Sami vrh stanice sadrži

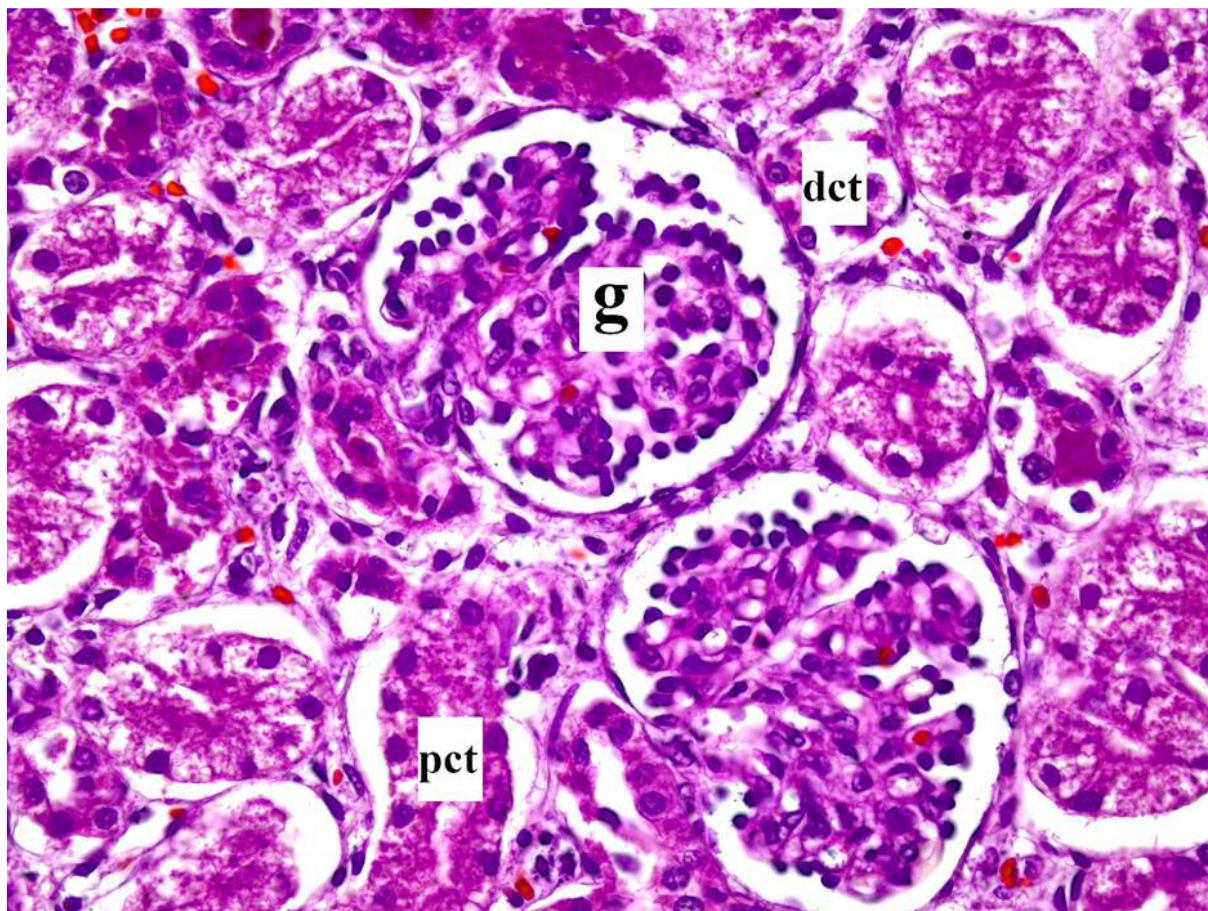
brojne mikrovile duge oko jednog mikrometra, koje čine četkastu prevlaku. Apikalna citoplazma ovih epitelnih stanica obiluje vezikulama smještenima između baza mikrovila, čime se povećava kapacitet tubularnih stanica za apsorpciju makromolekula. Mitohondriji su koncentrirani u bazalnom dijelu stanica i usmjereni vertikalno. Ovakav raspored mitohondrija, zajedno s povećanom površinom stanične membrane na bazi, karakterističan je za epitelne stanice koje aktivno sudjeluju u transportu iona. Zbog izraženih interdigitacija lateralnih membrana, granice između stanica proksimalnog kanalića nisu jasno vidljive pod svjetlosnim mikroskopom (28). Glomerularni filtrat formiran u bubrežnom tjelešcu ulazi u PCT, gdje započinje proces apsorpcije i sekrecije. PCT apsorbira iz filtrata sve aminokiseline i glukozu, oko 85 % natrijeva klorida (NaCl) i vode, kao i značajne količine fosfata i kalcija. Voda prolazi pasivnom difuzijom, prateći osmotski gradijent. Kada koncentracija glukoze u filtratu premaši apsorpcijski kapacitet PCT-a, urin postaje obilniji i sadrži povećane količine glukoze (33). HL ima oblik slova U. Sastoji se od debelog silaznog dijela, građom sličnog PCT, zatim tankog silaznog dijela, tankog uzlaznog dijela i debelog uzlaznog dijela, koji je građom sličan DCT. Otprilike jedna sedmina svih nefrona smještena je u blizini kortikomedularne granice te se nazivaju jukstamedularni nefroni, dok se ostali nazivaju kortikalnim nefronima. Svi oni sudjeluju u procesima filtracije, apsorpcije i sekrecije. Međutim, jukstamedularni nefroni ključni su za stvaranje gradijenta hipertoničnosti u intersticiju medule, što predstavlja osnovu sposobnosti bubrega da stvara hipertonični urin. Jukstamedularni nefroni imaju vrlo duge HL koje se protežu duboko u medulu. Te se petlje sastoje od kratkog debelog silaznog dijela, dugog tankog silaznog dijela, tankog uzlaznog dijela i debelog uzlaznog dijela. Nasuprot tome, kortikalni nefroni imaju vrlo kratke tanke silazne dijelove i nemaju tanke uzlazne dijelove (Slika 5) (28, 34).



Slika 5. Područje rasta u kori bubrega obuhvaća nefrogenu zonu (Nz) i jukstamedularnu regiju (Jr). Neposredno ispod bubrežne kapsule (C) nalazi se nefrogena zona, vidljiva kao bazofilni pojas nefrona u razvoju u vanjskom dijelu kore bubrega. Najstarije formirani glomeruli (g) povezuju se i integriraju u rastuću koru bubrega smještenu ispod nefrogene zone. Mlađi glomeruli gušće su raspoređeni u vanjskom dijelu kore, dok su stariji glomeruli razdvojeniji i smješteni bliže srži, zbog izvijanja i širenja kanalića. Proksimalni zavijeni kanalići (PCT) lako su prepoznatljivi ispod nefrogene zone zbog eozinofilne citoplazme. Fotografija je izvorno snimljena na arhiviranom preparatu ljudskog bubrega u 35. tjednu fetalnog razvoja. Slika je snimljena pri povećanju $\times 10$.

Kada debeli uzlazni dio HL uđe u koru bubrega, zadržava svoju histološku građu, ali postaje savijen i naziva se DCT. Ovaj kanalić obložen je kubičnim epitelom. DCT se razlikuje od PCT (Slika 6), iako su oba smještena u kori bubrega, u nekoliko značajki: stanice DCT-a manje su od stanica PCT-a, nemaju četkastu prevlaku i ne posjeduju apikalne vezikule. Stanice

DCT-a imaju složene invaginacije bazalne membrane povezane s mitohondrijima, što ukazuje na njihovu ulogu u aktivnom transportu iona (35).



Slika 6. Svjetlosnomikroskopska snimka kore bubrega čovjeka u razvoju. Glomeruli fetalnog bubrega (g) manji su od glomerula odrasle osobe, a podociti imaju karakterističan kubični izgled. Proksimalni zavijeni kanalići (PCT) lako se prepoznaju zbog eozinofilne citoplazme. Stanice distalnog zavijenog kanalića (DCT) su pločastije i manje od stanica proksimalnog zavijenog kanalića, uz odsustvo četkaste prevlake i apikalnih mjehurića. Fotografija je izvorno snimljena na arhiviranom preparatu ljudskog bubrega u 35. tjednu fetalnog razvoja. Slika je snimljena pri povećanju $\times 40$.

Iz DCT mokraća ulazi u sabirne kanaliće, koji se međusobno spajaju i formiraju veće, prave sabirne kanale. Ovi kanali postupno se šire i približavaju vrhovima medularnih piramida. Manji sabirni kanalići obloženi su kubičnim epitelom, dok se ulaskom dublje u medulu stanice epitelnih slojeva postepeno izdužuju i poprimaju cilindrični oblik. Na vrhovima medularnih piramida promjer sabirnih kanala doseže oko 200 μm . Duž cijelog svog toka sabirni kanalići i kanali građeni su od stanica koje se slabo boje uobičajenim histološkim metodama. Te stanice

imaju elektronski svijetlu citoplazmu s malo organela. U sabirnim kanalićima i kanalima kore prisutne su tamno obojene umetnute (interkalarne) stanice, čija funkcija još nije u potpunosti razjašnjena. Odvodni kanali u bubrežnoj srži imaju ključnu ulogu u koncentriranju urina (28). Uz samo bubrežno tjelešće nalazi se tunica media aferentne arteriole, s modificiranim glatkim mišićnim stanicama koje se nazivaju jukstaglomerularne (JG) stanice. Ove stanice imaju citoplazmu ispunjenu sekretornim granulama. Sekret JG stanica igra važnu ulogu u održavanju krvnog tlaka. Makula densa DCT-a obično je smještena u blizini dijela aferentne arteriole koji sadrži JG stanice. Zajedno, taj dio arteriole i makula densa čine JG aparat. Na elektronskom mikroskopu JG stanice pokazuju karakteristike stanica specijaliziranih za sintezu proteina, uključujući obilje granularnog endoplazmatskog retikuluma, razvijen Golgijev aparat i prisutnost sekretornih granula promjera 10 do 40 nm. JG stanice sintetiziraju hormon renin, koji djeluje na plazmatski protein angiotenzinogen, pri čemu nastaje neaktivni deka-peptid angiotenzin I. Djelovanjem konvertirajućeg enzima, koji se u visokoj koncentraciji nalazi u endotelnim stanicama pluća, angiotenzin I gubi dvije aminokiseline i prelazi u aktivni vazopresivni oktapeptid, angiotenzin II (28, 31).

1.3. Anatomija i histologija odraslog mišjeg bubrega

Bubrezi odraslog miša su mali, glatki, crvenosmeđi organi oblika zrna graha, smješteni retroperitonealno uz stražnju trbušnu stijenu, slično kao i kod čovjeka. Duljina bubrega miša iznosi prosječno 8–10 mm, a težina oko 150–200 mg (36). Površina bubrega je glatka, bez lobulacija koje su ponekad izraženije kod nekih vrsta. Mikroskopski, bubrežna građa miša podijeljena je na korteks i medulu. Korteks zauzima periferni dio bubrega i sadrži glomerule, PCT i DCT, početne dijelove sabirnih kanalića te HL. Broj glomerula u bubrezima miša manji je nego kod čovjeka, no gustoća glomerularne raspodjele u korteksu je visoka. Glomeruli su manji (promjera oko 70–90 μm) u odnosu na ljudske (150–200 μm), a Bowmanova kapsula jasno omeđuju glomerularne kapilare (37). Podociti koji oblažu unutarnji sloj Bowmanove kapsule formiraju primarne i sekundarne izdanke (nožice), stvarajući filtracijsku barijeru zajedno s fenestriranim endotelom kapilara i bazalnom membranom. Struktura filtracijske barijere slična je onoj kod čovjeka, iako je bazalna membrana proporcionalno tanja u miša (38).

PCT obloženi su kubičnim epitelom s izraženom četkastom prevlakom, formiranom mikrovilima bogatim aktinskim filamentima. Citoplazma stanica PCT-a pokazuje izrazitu eozinofiliju zbog velike količine mitohondrija, slično kao u ljudskom bubregu (39). Nasuprot tome, DCT imaju stanice manje visine, bez četkaste prevlake, i manje izraženu eozinofiliju, ali

s izraženim bazalnim invaginacijama povezanim s brojnim mitohondrijima, što ukazuje na funkciju u reapsorpciji iona (28). Medula bubrega miša podijeljena je na vanjsku i unutarnju medulu te papilu. U meduli se nalaze ravni dijelovi proksimalnih i distalnih kanalića, HL i sabirni kanalići. HL kod miša, osobito kod jukstamedularnih nefrona, produžuju se duboko u unutarnju medulu, omogućujući stvaranje hipertoničnog gradijenta neophodnog za koncentriranje mokraće. Međutim, miš ima kraće HL u usporedbi s čovjekom, zbog čega je njihova sposobnost koncentriranja mokraće nešto ograničenija (40). Sabirni kanalići i veći sabirni kanali građeni su od glavnih i umetnutih stanica. Glavne stanice sudjeluju u regulaciji ravnoteže vode i natrija putem hormona aldosterona i antidiuretskog hormona (ADH), dok umetnute stanice reguliraju acido-baznu ravnotežu. Histološki, stanice sabirnih kanalića u miša slabije se boje uobičajenim histološkim bojama, slično kao kod čovjeka (41). Bubrežni krvotok miša također pokazuje opće karakteristike sisavaca. Aferentne arteriole dovode krv u glomerule, dok eferentne arteriole formiraju peritubularne kapilare korteksa, omogućujući održavanje osmotskog gradijenta. Iako osnovna organizacija krvotoka odgovara ljudskom bubregu, brzina protoka krvi i volumni omjer kortikalnog i medularnog protoka prilagođeni su manjoj veličini i metaboličkim zahtjevima miša (42).

Zaključno, bubreg odraslog miša, iako manjih dimenzija, zadržava sve osnovne anatomske i histološke karakteristike bubrega sisavca, uz specifične prilagodbe povezane s veličinom i fiziološkim potrebama.

1.4. Fiziologija bubrega

Bubrezi su ključni organi za održavanje homeostatske ravnoteže tijela, prvenstveno kroz procese filtracije, resorpcije, sekrecije i izlučivanja. Svakog dana bubrezi čovjeka filtriraju približno 180 litara plazme, stvarajući oko 1,5 litara urina (31). Glomerularna filtracija započinje u bubrežnim tjelešcima gdje filtracijska barijera, građena od fenestriranog endotela, glomerularne bazalne membrane i podocita, selektivno propušta vodu i male molekule, dok zadržava stanice i proteine (43). Glomerularna filtracija regulira se mehanizmima poput miogenog odgovora, tubuloglomerularna povratna sprega i hormonski utjecaji putem renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) (44). PCT predstavlja mjesto gdje se resorbira oko 65–70% filtrirane vode i natrija, te gotovo sva glukoza i aminokiseline (39). Resorpcija u PCT-u je izuzetno učinkovita zahvaljujući velikoj membranskoj površini s četkastom prevlakom, brojnim mitohondrijima potrebnima za aktivni transport i izraženim interdigitacijama staničnih membrana. Transport natrija pomoću Na^+/K^+ -ATPaze stvara osmotski gradijent koji povlači vodu pasivnom difuzijom, dok se glukoza i aminokiseline resorbiraju putem sekundarno

aktivnog transporta (45). Ako koncentracija glukoze u filtratu premaši transportni maksimum, glukoza se pojavljuje u urinu (glukozurija) (31).

HL, osobito njezini tanki silazni i tanki uzlazni segmenti, ima ključnu ulogu u stvaranju kortikomedularnog osmotskog gradijenta, neophodnog za koncentriranje urina. Silazni krak je vrlo propustan za vodu, ali malo za sol, dok je uzlazni krak nepropustan za vodu, ali aktivno transportira natrij, kalij i klorid, osobito u debelom uzlaznom dijelu (46). Ovaj protustrujni mehanizam omogućava bubregu stvaranje visokih osmotskih gradijenata u meduli, ključnih za kasniju resorpciju vode pod utjecajem ADH-a. DCT sudjeluje u finom podešavanju ionske ravnoteže, posebno resorpciji natrija (pod kontrolom aldosterona) i sekreciji kalija i vodikovih iona (47). Stanice DCT-a su manje, s manje izraženim mikrovilima u usporedbi s PCT-om, odražavajući njihovu glavnu funkciju za preciznu regulaciju, a ne masovnu resorpciju.

Uz tubulske funkcije, bubreg sudjeluje i u endokrinoj regulaciji krvnog tlaka lučenjem renina iz jukstaglomerularnih stanica, čime započinje kaskada RAAS-a koja podiže sistemski krvni tlak i povisuje resorpciju natrija i vode (48). Kod miša su osnovni principi bubrežne fiziologije isti kao kod čovjeka, uz određene razlike: mišji bubrezi imaju veću proporciju kortikalnih nefrona i nešto nižu sposobnost koncentriranja urina zbog kraćih HL (49).

1.5. Prirođene anomalije bubrega i mokraćnih puteva (CAKUT)

Prirođene anomalije bubrega i mokraćnih puteva (CAKUT) predstavljaju vrlo heterogenu skupinu malformacija koje obuhvaćaju široki spektar kliničkih manifestacija, od bezazlenih anatomskih varijacija do teških defekata koji rezultiraju terminalnim stadijem bubrežne bolesti. Prema epidemiološkim podacima, CAKUT čine do 23% svih prirođenih anomalija otkrivenih tijekom prenatalnog razvoja, a incidencija se procjenjuje na 1 do 4 slučaja na 1000 trudnoća (50, 51). Ove malformacije mogu biti izolirane ili dio složenijih sindromskih poremećaja, što ukazuje na njihovu raznoliku etiopatogenezu (51, 52). Najteži oblici CAKUT-a nastaju kao posljedica poremećene diferencijacije ili međudjelovanja ureteričkog pupoljka i metanefričkog mezenhima tijekom embriogeneze, dok manje izražene anomalije obično nastaju u kasnijim fazama razvoja (53, 54). Među najčešćim oblicima CAKUT-a ubrajaju se ageneza bubrega, hipodizplastični bubrezi, hidronefroza, megaureter, duplikacija uretera, opstrukcija ureteropelvičnog spoja (UPJO), vezikoureteralni refluks (VUR), opstrukcija ureterovezikalnog spoja (UVJO) i posteriorni uretralni zalisci (PUV) (Tablica 1) (52).

Tablica 1. Karakteristike CAKUT anomalija (50-52, 55-58).

Vrsta anomalije	CAKUT fenotip	Definicija	Učestalost	Mutacije gena	Razvojni proces
Broj bubrega	Ageneza bubrega	Jednostrani ili obostrani izostanak stvaranja bubrega.	1:1250	PAX2, EYA1, RET, GDNF, SALL1, itd.	Razvoj Wolffovog kanala, indukcija mokraćovodnog pupoljka
Veličina i morfologija bubrega	Hipoplazija bubrega	Smanjena bubrežna masa uz očuvanu histološku strukturu.	1:4000	PAX2, GDNF, FGF7, FGFR2, itd.	Proces grananja mokraćovodnog pupoljka
	Displazija bubrega	Nerazmjerna organizacija parenhima, često s cistama.	1:5000	HNF1B, SIX2, GLI3, PBX1, itd.	Proces diferencijacije i nefrogeneze
	Policistična displazija bubrega	Brojne ciste u displastičnom bubregu.	1:4300	HNF1B, ACE, PAX2, REN, itd.	Proces razvoja osnovne građe bubrega
Položaj bubrega	Pokrovkasti bubreg	Spojeni bubrezi (najčešće donjim polovima).	1:800	FOXD1, PBX1	Poremećaji signala strome, disfunkcija metanefričkog mezenhima
	Ektopični bubreg	Bubreg se razvije na atipičnom položaju.	1:1000–1:1200	FOXD1, PBX1	Nepravilna migracija tijekom razvoja

Tablica 1. Nastavak

Anomalije odvodnog sustava	UPJO	Opstrukcija ureteropelvičnog spoja uz dilataciju bubrežne zdjelice.	1:1000	RET, GDNF, ROBO2	Maturacija uretera
	UVJO	Opstrukcija ureterovezikalnog spoja.	1:1500	RET, GDNF, ROBO2, LIM1, itd.	Proces maturacije uretera
	VUR	Povratni tok mokraće iz mokraćnog mjehura prema bubrežima.	1:50–1:500	RET, ROBO2, BMP4, PAX2, itd.	Proces zatvaranja Wolffovog kanala i lokacije uretera
	Megaureter	Proširenje uretera, često uz funkcionalnu ili anatomsku opstrukciju.	1:500	GDNF, RET, ROBO2	Indukcija mokraćovodnog pupoljka
	Duplicirani ureter	Postojanje dvostrukih uretera iz jednog bubrega.	1:125	FOXC1, PAX2, itd.	Aberantni razvoj mokraćovodnog pupoljka
	PUV	Opstruktivne membrane stražnjeg dijela uretre kod dječaka.	1:5000–1:8000	FOXC2, GATA2, HOXA13, LIMP2, itd.	Malformacija u razvoju mokraćne cijevi

UPJO - opstrukcija ureteropelvičnog spoja; UVJO - opstrukcija ureterovezikalnog spoja; VUR - vezikoureteralni refluks; PUV - valva stražnje mokraćne cijevi

Etiologija CAKUT-a izrazito je kompleksna i multifaktorijalna, uključujući genetske, epigenetske i okolišne čimbenike (Tablica 1). Poznato je da oko 15–16% slučajeva ima prepoznatljivu genetsku osnovu, pri čemu značajan dio bolesnika pokazuje obiteljsku agregaciju s autosomno dominantnim načinom nasljeđivanja, varijabilnom ekspresivnošću i nepotpunom penetrantnošću (52). Identificirano je oko 40 monogenских uzroka za izolirane oblike CAKUT-a (mutacije u genima poput HNF1B, PAX2, EYA1, SALL1, GATA3 i PBX1), dok je više od 150 monogenских sindroma povezano s CAKUT-om (npr. Potterov sindrom, Fraserov sindrom, Allagilleov sindrom, Prune-belly sindrom) (52, 59). Važnu ulogu imaju i varijacije broja kopija (CNV) te submikroskopske kromosomske aberacije, koje često ostaju

dijagnostički izazov, kao što je primjerice delecija 22q11.2 regije u DiGeorgeovom sindromu (52, 60).

Ekstrinzični čimbenici također značajno doprinose razvoju CAKUT-a. Među njima su najznačajniji dijabetes majke, deficit folne kiseline i željeza, kao i izloženost određenim lijekovima tijekom trudnoće, što dodatno potvrđuje važnost okolišnih utjecaja u modulaciji ekspresije genetskih abnormalnosti (50). Moderna genetska tehnologija, uključujući panele gena temeljenih na tehnologiji sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing* - NGS) i sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *whole exome sequencing* - WES), omogućila je značajan napredak u otkrivanju genetskih uzroka CAKUT-a (51). Ipak, s obzirom na moguću prisutnost patoloških promjena u intronskim regijama i CNV, sve više se primjenjuje i sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing* - WGS) (51). Pravodobno genetsko testiranje od ključne je važnosti, posebice u bolesnika s obiteljskim ili sindromskim oblicima bolesti, jer omogućuje ranu dijagnozu, savjetovanje i potencijalnu ciljanu terapiju (52).

Razumijevanje patofiziologije CAKUT-a i dalje predstavlja izazov zbog njihove kliničke heterogenosti i složenosti razvojnog puta (61). Međutim, uz razvoj personalizirane medicine i snižavanje troškova genetskog testiranja, raste mogućnost pravovremenog prepoznavanja bolesti i prevencije progresije prema terminalnoj bubrežnoj bolesti (62, 63). Nadalje, razvoj modela induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC) i bubrežnih organoida otvara nove perspektive u istraživanju patogeneze, kao i u razvoju personaliziranih terapijskih pristupa (64-66).

1.5.1. Dijagnostičke mogućnosti prirođenih anomalija mokraćnog sustava

Dijagnostika CAKUT-a temelji se na kombinaciji prenatalnog otkrivanja, postnatalnih slikovnih metoda i genetskog testiranja, a najvažniju ulogu u ranom prepoznavanju ima prenatalna ultrazvučna dijagnostika. Oko 60–80% CAKUT-a otkriva se antenatalno, najčešće u drugom tromjesečju trudnoće, kada rutinski ultrazvučni pregled može pokazati kliničke znakove poput hidronefroze, odsutnosti jednog bubrega, cistične formacije ili povećanog mokraćnog mjehura (67, 68). Hidronefroza je pritom najčešći nalaz i može predstavljati širok spektar poremećaja — od benignih varijanti do značajnih opstrukcija koje zahtijevaju kirurško liječenje. Kriteriji za praćenje i klasifikaciju fetalne hidronefroze temelje se na mjerenju anteroposteriornog promjera bubrežne zdjelice (AP diametar), čija progresija ili udruženost s drugim anomalijama može ukazivati na potrebu za postnatalnom evaluacijom (61).

Prepoznavanje rizičnih roditelja temelji se na obiteljskoj anamnezi i genetskom savjetovanju. Budući da oko 15% slučajeva CAKUT-a pokazuje hereditarnost, posebice s autosomno dominantnim nasljeđivanjem, roditelji koji su i sami imali anomalije bubrega, ali i oni s već ranijim djetetom s CAKUT-om, smatraju se visoko rizičnima (69). Takve obitelji trebale bi biti uključene u genetsko testiranje i savjetovanje, osobito ako su u pitanju sindromske forme bolesti ili dodatne anomalije izvan mokraćnog sustava. U posljednjem desetljeću značajan napredak postignut je primjenom WES i osobito WGS, koje omogućuju otkrivanje i intronskih mutacija, a koje klasične metode ne mogu detektirati (51, 52). Tehnologije poput NGS omogućuju analizu više CAKUT-povezanih gena u jednom postupku, čime se povećava dijagnostička osjetljivost, osobito kod sporadičnih i sindromskih slučajeva. Među najčešće mutirane gene povezane s izoliranim CAKUT fenotipovima ubrajaju se HNF1B, PAX2, EYA1, dok se kod sindromskih oblika često nalaze mutacije u genima poput CHD7, NOTCH2 i KMT2D (52).

Što se tiče kliničke manifestacije, CAKUT se može prezentirati u različitim životnim fazama. U ranom neonatalnom razdoblju, klinički znakovi primarno ovise o tipu anomalije, a uključuju palpabilnu abdominalnu masu, opstruktivne uropatije, infekcije mokraćnog sustava (IMS) i oliguriju. Značajan broj djece ostaje asimptomatsko, a anomalija se otkriva tek tijekom sistematskog pregleda ili obrade zbog infekcija u kasnijoj životnoj dobi. Kod starije djece se CAKUT može manifestirati kao hipertenzija, proteinurija, smanjena bubrežna funkcija ili progresivna kronična bubrežna bolest (CKD), pri čemu čak do 50% djece sa završnom bubrežnom bolešću ima uzrok u CAKUT fenotipovima (70-73).

S obzirom na kompleksnost kliničke slike i etiologije, pravodobna dijagnoza i multidisciplinarni pristup ključni su za optimizaciju ishoda. Prenatalno praćenje, rana postnatalna evaluacija, genetsko testiranje i sustavno praćenje funkcije bubrega čine osnovu suvremenog pristupa dijagnostici i liječenju prirođenih anomalija mokraćnog sustava.

1.5.2. Terapijske mogućnosti prirođenih anomalija mokraćnog sustava

Terapijske mogućnosti za CAKUT ovise o vrsti i težini anomalije, a pristup liječenju uključuje kirurške intervencije, medikamentoznu terapiju i, u težim slučajevima, dijalizu ili transplantaciju bubrega. Kirurški zahvati su često potrebni kod opstruktivnih anomalija poput UPJO, PUV i VUR-a. Standardne procedure uključuju pijeloplastiku, endoskopsku ablaciju zalistaka i reimplantaciju uretera, što omogućuje očuvanje bubrežne funkcije i smanjenje rizika od IMS. Studije pokazuju da je oko 58% djece s CAKUT-om podvrgnuto kirurškim intervencijama, dok je 42% liječeno konzervativno (74). Djeca s jednostranom bubrežnom

agenezom često žive bez značajnih tegoba zahvaljujući kompenzacijskim mehanizmima preostalog bubrega. Međutim, prisutnost dodatnih anomalija, poput hidronefroze ili VUR-a, povećava rizik od razvoja hipertenzije i proteinurije, što može dovesti do progresije CKD (75).

Medikamentozna terapija, uključujući primjenu inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE inhibitora) (76), ključna je za usporavanje napredovanja bolesti i očuvanje bubrežne funkcije. U slučajevima kada dođe do terminalne bubrežne insuficijencije, dijaliza i transplantacija bubrega postaju neophodne terapijske opcije. Istraživanja pokazuju da većina pedijatrijskih nefroloških centara pruža neonatalnu dijalizu, s varijabilnim pristupima ovisno o specifičnostima slučaja (76, 77).

Rani prenatalni screening i postnatalno praćenje ključni su za pravodobnu dijagnozu i intervenciju, čime se povećava šansa za očuvanje bubrežne funkcije i smanjenje komplikacija.

1.6. Značaj animalnih modela u istraživanjima bolesti bubrega

Animalni modeli predstavljaju neizostavan alat u istraživanju bubrežnih bolesti jer omogućuju detaljno razumijevanje mehanizama embriogeneze, fiziologije bubrega, kao i razvoja patoloških procesa poput cističnih bolesti, glomerulopatija i tubulointersticijskih poremećaja (78). Njihova primjena omogućuje translaciju osnovnih znanstvenih spoznaja u kliničku praksu te razvoj i testiranje novih terapijskih pristupa prije nego što se one primijene u ljudi (79). Najčešće korišten model u biomedicinskim studijama je miš (lat. *Mus musculus*), zahvaljujući visokom stupnju genetske i funkcionalne sličnosti s ljudskim organizmom, relativno kratkom reproduktivnom ciklusu te dobro razvijenim tehnikama genetske manipulacije. Mišji modeli omogućuju ciljano "utišavanje" gena (knockout), umetanje mutacija (knockin), inducibilne mutacije (Cre-LoxP sustav), kao i upotrebu transgenih linija za izražavanje proteina u točno definiranim tkivima i vremenskim točkama. Takav pristup omogućuje modeliranje CAKUT-a, CKD, nefrotskog sindroma i autosomno dominantne policistične bolesti bubrega (ADPKD) (80). Primjerice, knockout *Hnf1b* mišji modeli reproduciraju fenotipove koji uključuju hipodizplaziju bubrega, cistične promjene i poremećaje u ureterovezikalnoj migraciji – što izravno odražava kliničku sliku u ljudi s *HNF1B* mutacijom (81). Osim toga, mišji embrionalni razvoj vrlo je dobro opisan i može se paralelno uspoređivati s ljudskim razvojnim fazama (npr. završetak organogeneze kod miša oko 14. dana gestacije odgovara 8. do 9. tjednu intrauterinog života kod čovjeka), što dodatno potvrđuje njegovu vrijednost u razvojnim nefrološkim istraživanjima (82).

Osim miševa, sve više se u nefrološkom istraživanju koristi zebrica (lat. *Danio rerio*), zbog svoje genomske sličnosti s ljudima, prozirnih embrija i mogućnosti praćenja razvoja nefrona u realnom vremenu. Zebrice, kao i čovjek posjeduju pronefros, a homologni mehanizmi koji upravljaju nefrogenezom (poput *wt1*, *pax2*, *podocin*) omogućuju modeliranje bolesti poput podocitopatija, cistične bolesti i različitih bubrežnih malformacija (83, 84).

Svinje, osobito minijature pasmine poput *Göttingenske svinje*, koriste se zbog anatomske i fiziološke sličnosti s ljudskim mokraćnim sustavom. One su iznimno korisne u translacijskim istraživanjima, testiranju novih dijagnostičkih pristupa (npr. MRI vizualizacije nefropatija) te kao platforma za procjenu učinkovitosti regenerativnih i farmakoloških terapija prije kliničkih studija (85). Modeli poput *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster* unatoč svojoj morfološkoj jednostavnosti, omogućuju istraživanje osnovnih molekularnih i staničnih mehanizama relevantnih za razvoj bubrega. Npr., u *C. elegansu* su istražene funkcije gena kao što su *daf-2* i *ins-7*, povezane s regulacijom autofagije i homeostaze, dok su kod *Drosophile* proučavani geni uključeni u razvoj Malpighijevih tubula – struktura funkcionalno sličnih renalnim tubulima u ljudi (86, 87).

1.7. Yotari miš

Yotari miš (*Dab1*^{-/-}) predstavlja prirodni neurološki mutantni model koji fenotipski snažno podsjeća na poznatog *reeler* miša. Ovaj mutant nastao je spontano kao potomak muškog kimernog miša koji je nosio mutaciju receptora za inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3R1), a kasnije je utvrđeno da je uzrok mutacije gubitak funkcije gena *Disabled-1 (Dab1)* (88, 89). Oba modela – *yotari* miš s mutacijom u *Dab1* i *reeler* miš s delecijom u 3' kodirajućem području *Reelin* gena – pokazuju gotovo identičan fenotip: nestabilan hod, tremor i preranu smrt, obično oko vremena prestanka dojenja (90-93). Sličnosti u fenotipu između *yotari* i *reeler* miševa snažno upućuju na to da je DAB1 protein ključni intracelularni posrednik u Reelin signalnom putu, koji je odgovoran za pravilnu migraciju i organizaciju neurona tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava (88, 91). Važnost ovog signalnog puta potvrđuju brojna istraživanja koja su identificirala njegovu ulogu u neuropsihijatrijskim poremećajima, uključujući shizofreniju, autizam i bipolarni poremećaj, gdje su polimorfizmi u *Reelin* genu povezani s povećanim rizikom za navedene bolesti (94-96).

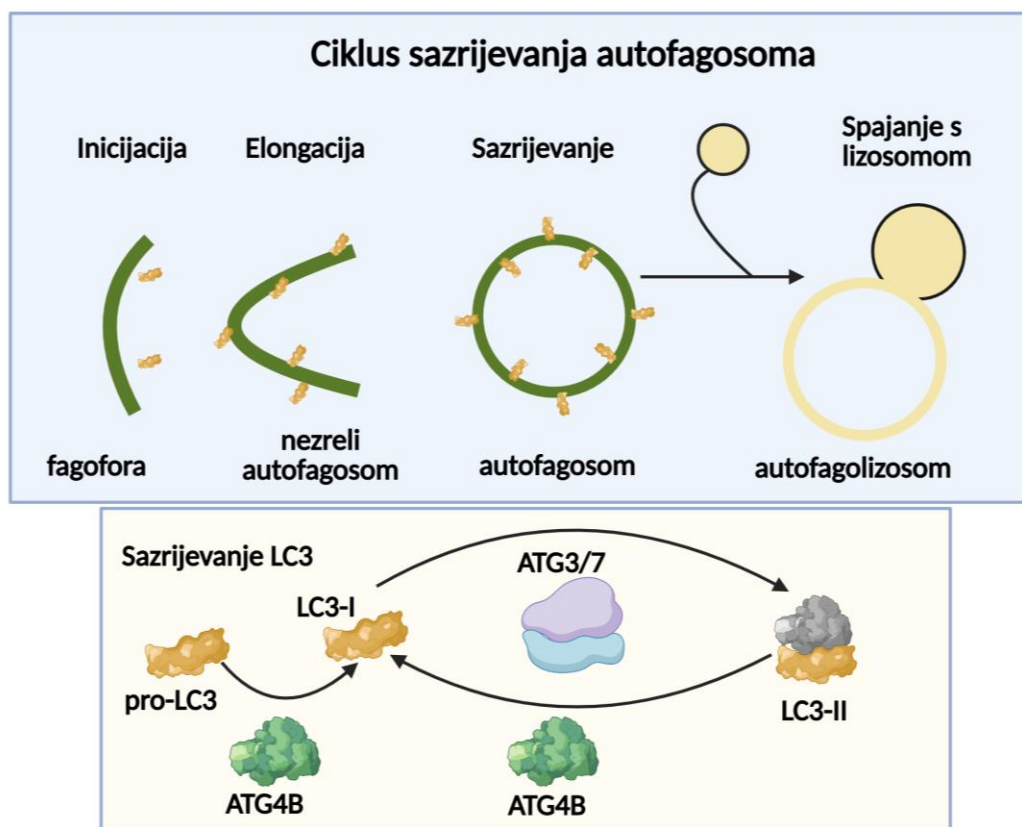
Iako je većina ranijih istraživanja bila usmjerena na neurološku funkciju Reelin/DAB1 signalnog puta, sve je više dokaza o njegovoj ekspresiji i funkciji u neneuronalnim tkivima. Upotrebom Western blot tehnike, prisutnost Reelin-a potvrđena je u plazmi ljudi, miševa i

štakora (97). Nadalje, tehnike poput northern blot-a, RT-PCR-a i in situ hibridizacije pokazale su ekspresiju Reelin i Dab1 mRNA u slezeni, jetri, bubregu, testisu, kao i u intersticijskim regijama jajnika (91, 98-100).

Otkriće Reelin/DAB1 signalnog puta izvan mozga otvorilo je nova istraživačka područja, uključujući njegovu moguću ulogu u razvoju i bolesti bubrega, imunosnom odgovoru, vaskularnoj stabilnosti i razvoju reproduktivnih organa (101). Ova otkrića upućuju na to da *yotari* miš, uz neurološka istraživanja, može predstavljati vrijedan model i za istraživanja sustavnih razvojnih poremećaja, uključujući i prirođene anomalije mokraćnog sustava.

1.8. Autofagija i apoptoza u bolestim bubrega

Autofagija predstavlja prirodan, evolucijski konzervativan stanični proces kojim se pomoću lizosomski ovisnog mehanizma uklanjaju disfunkcionalne stanične komponente. Za razliku od apoptoze, koja rezultira programiranom staničnom smrću, autofagija pridonosi održavanju stanične homeostaze recikliranjem selektivnih organela i korisnih molekula, čime potiče preživljavanje stanice u uvjetima stresa (102). Tijekom autofagije dolazi do stvaranja autofagosoma, membranskih vezikula koje "progutaju" (engl. *engulf*) oštećene organele i proteine. Autofagosomi se zatim spajaju s lizosomima stvarajući autolizosom (Slika 7), unutar kojeg se sadržaj razgrađuje djelovanjem lizosomskih hidrolaza. LC3B, koji pripada obitelji mikrotubulima pridruženih proteina i homologan je *Atg8* genu iz kvasca, nakon lipidacije prelazi u oblik LC3-II koji se veže za membranu autofagosoma, a njegova se razina u stanicama danas koristi kao pouzdan biomarker za kvantifikaciju aktivnosti autofagije (103, 104). Zhang Y. i suradnici su u recentnoj studiji metodom Western blot i SP-obilježavanja pokazali značajno povećanje ekspresije LC3B-I i LC3B-II proteina u bubrezima nakon ozljede, s naknadnim blagim smanjenjem njihove ekspresije tijekom reparacije, što upućuje na potencijalnu ulogu autofagije u procesu oporavka bubrežnog tkiva (105).



Slika 7. Shematski prikaz sazrijevanja LC3. Pro-LC3 se pretvara u LC3-I cijepanjem izloženih glicinskih ostataka na C-terminalnom kraju, što posreduje cisteinska proteaza ATG4B. ATG3/7 posreduju u pretvorbi LC3-I u LC3-II dodavanjem fosfatidiletanolaminske (PE) skupine, što omogućuje ugradnju LC3-II u membranu autofagosoma. Recikliranje LC3-II natrag u LC3-I također posreduje ATG4B. Slika je izrađena u Biorender softveru.

Poseban oblik autofagije, poznat kao šaperonski posredovana autofagija (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA), ima važnu ulogu u uklanjanju oksidiranih proteina. Ključna komponenta CMA mehanizma je LAMP2A (engl. *lysosome-associated membrane protein 2A*), koji djeluje kao receptor na lizosomskoj membrani (106). Nakon vezanja kompleksa šaperon-protein, LAMP2A omogućuje translokaciju ciljanih proteina u lumen lizosoma, gdje se oni razgrađuju putem lizosomskih proteaza (107). Zhang J. i sur. su analizom bubrežnog tkiva pokazali da je distribucija LAMP2A ograničena na apikalne dijelove stanica proksimalnog tubula, dok je izostajala u bazalnim dijelovima, što sugerira lokus-specifičnu aktivnost CMA u bolestima bubrega (108). Šaperoni, poznati i kao proteini toplotnog šoka (engl. *heat shock proteins* – HSP), djeluju kao regulatori stanične homeostaze i apoptoze. Njihova funkcija uključuje ponovno savijanje denaturiranih proteina i uklanjanje nepovratno

oštećenih molekula, čime se sprječava apoptoza i potiče preživljavanje stanica (109). Među najistraživanijima je obitelj HSP70, koja obuhvaća šaperone molekularne mase oko 70 kDa, ključne za regulaciju proteinske ravnoteže i odgovora na stanični stres (110). Nedavna istraživanja sugeriraju da obitelj HSP70 ima važnu ulogu i tijekom ranog razvoja bubrega, osobito u kontekstu oksidativnog stresa i regulacije apoptoze (111). Unutar te obitelji, GRP78 (engl. *glucose-regulated protein 78*) ima ključnu funkciju u uvjetima stresa endoplazmatskog retikuluma (ER), gdje djeluje kao senzor za nepravilno presavijene proteine. Tijekom ER stresa, GRP78 se odvaja od PERK (engl. *protein kinase RNA-like ER kinase*) receptora i veže uz native proteine, čime inhibira signalnu kaskadu koja vodi k apoptozi (112). U bolesti bubrega poput dijabetičke nefropatije, fibroze, proteinurije i prirođenih anomalija, ER stres je izrazito izražen, a razine GRP78 u serumu značajno su više u bolesnika s dijabetesom tipa 2 u usporedbi s kontrolnom skupinom, što ga čini potencijalnim biomarkerom i terapijskim ciljem (112). Jedan od ključnih markera programirane stanične smrti, uz klasične kaspazne puteve, je i AIF (engl. *apoptosis-inducing factor*) – mitohondrijski flavoprotein koji igra značajnu ulogu u kaspaza-neovisnom obliku apoptoze. U trenutku kada apoptozni signal prevlada nad staničnim mehanizmima preživljavanja, AIF se podvrgava proteolizi, translocira u jezgru, gdje potiče kondenzaciju kromatina i opsežnu fragmentaciju DNA, čime se pokreće ireverzibilni proces stanične smrti (113).

Iako su apoptoza i autofagija tradicionalno promatrane kao zasebni procesi – prva destruktivna, a druga stanično-protektivna, sve je više dokaza da među njima postoji značajna regulacijska međupovezanost, uključujući i zajedničke molekularne puteve. Naročito je zanimljiv regulatorni dijalog između AIF-posredovane apoptoze i autofagije, koji se može uočiti u različitim tipovima stanica i eksperimentalnim modelima. Primjerice, u HCT116 stanicama kolorektalnog karcinoma tretiranim Lapatinibom (inhibitor tirozin kinaze) opažena je istodobna aktivacija autofagije i AIF-posredovane apoptoze, što sugerira funkcionalnu suradnju dvaju procesa u kontekstu antitumorskog djelovanja (114). Slično tome, u stanicama malignog rabdoidnog tumora, histonski deacetilazni inhibitor FK228 inducirao je autofagiju putem translokacije AIF-a, dodatno potvrđujući ulogu ovog proteina kao spojišta između procesa autofagije i apoptoze (115). Osim u tumorskim modelima, istraživanja sugeriraju moguću ulogu AIF-a i u razvoju bubrega. Studija provedena od strane našeg istraživačkog tima pokazala je da AIF, zajedno s drugim regulatorima apoptoze i razvoja (CRKL, AIFM3, BCL2, UBASH3A), nije izražen u ranim strukturama nefrona tijekom razvoja ljudskog bubrega, što

implicira da njegova uloga nije ključna u inicijalnim fazama nefrogeneze ili da je strogo vremenski regulirana (116).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

Ovo istraživanje ima za cilj analizirati učinak funkcionalnog utišavanja *Dab1* gena na ekspresiju i lokalizaciju biljega autofagije LC3B, LAMP2A, GRP78 i HSC70, te biljega apoptoze A11 i AIF u razvojnim i postnatalnim bubrezima *Dab1*^{-/-} (*yotari*) miševa. Bolje razumijevanje normalne ekspresije ovih proteinskih biljega može dovesti i do bolje dijagnostike, ali i terapijskih modaliteta u bubrežnoj patologiji.

Također, nakon provedenog istraživanja na bubrežnom tkivu knock-out miševa, analizirat ćemo i prostorno-vremenski obrazac izražaja LC3B, LAMP2A, GRP78, HSP70 u normalnom razvoju ljudskih bubrega (CTRL) i razvoju bubrega zahvaćenih CAKUT-om (dvostruki ureter (DU), hipoplastični bubreg (HYP) i displastični bubrezi (DYS)) od 22. do 41. tjedna fetalnog razvoja, kako bismo ispitali promjene izražaja gena i njihovih proteina povezanih s pojavom CAKUT-a.

Specifični ciljevi istraživanja:

- 1) Utvrditi i kvantificirati izražaj biljega autofagije LC3B, LAMP2A, GRP78, HSC70, te apoptoze A11 i AIF u različitim strukturama bubrega *Dab1*^{-/-} (*yotari*) i kontrolnih miševa gestacijskih dana 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) te 4. (P4), 11. (P11) i 14. (P14) postnatalnog dana primjenom indirektne imunofluorescence.
- 2) Utvrditi i kvantificirati vremenski i prostorni izražaj biljega autofagije LC3B, LAMP2A, GRP78 i HSP70 u razvojnim stadijima bubrega (CTRL) i razvoju bubrega zahvaćenih CAKUT-om (DU, HYP i DYS) od 22. do 41. tjedna fetalnog razvoja, primjenom indirektne imunofluorescence.
- 3) Utvrditi postoji li razlika u prostornom i vremenskom izražaju navedenih biljega autofagije između čovjeka i miša u odgovarajućim stadijima korištenjem imunofluorescence.
- 4) Razmotriti mogućnosti dijagnostičke i terapijske primjene navedenih biljega.

2.2. Hipoteza istraživanja

Razina ekspresije biljega autofagije i apoptoze (LC3B, GRP78, LAMP2A, HSC70, A11 i AIF) ima važnu ulogu u regulaciji stanične homeostaze tijekom fetalnog razvoja bubrega miša, te promijenjena ekspresija navedenih biljega može dovesti do razvoja urođenih anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT).

Razina ekspresije biljega autofagije (LC3B, GRP78, LAMP2A, HSP70) ima važnu ulogu u regulaciji stanične homeostaze tijekom fetalnog razvoja bubrega čovjeka, te promijenjena ekspresija navedenih biljega može dovesti do razvoja urođenih anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT).

3. MATERIJALI I METODE

U ovom odjeljku opisani su relevantni postupci prikupljanja, obrade i analize animalnih i humanih uzoraka korištenih u istraživanju. Prikazani su protokoli imunofluorescencijskog bojanja koji uključuju primjenu specifičnih primarnih i sekundarnih protutijela, kao i svi koraci provedeni u svrhu vizualizacije i kvantificiranja signala. Nadalje, detaljno su opisane metode statističke obrade podataka korištene za evaluaciju rezultata, uključujući primijenjene testove, pragove značajnosti te softverske alate korištene u analizi.

3.1. Etička dozvola

Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu odobrili su provedbu ovog istraživanja (klasa: 003-08/23-03/0015; ur. broj: 2181-198-03-04-23-0073). Tijekom istraživanja dosljedno su poštovani temeljni etički i bioetički principi, uključujući osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i načelo neškodljivosti, u skladu s odredbama Nürnberškog kodeksa i Helsinške deklaracije (64. Opća skupština WMA, Fortaleza, Brazil, listopad 2013.), kao i njezinim naknadnim dopunama. Svi prikupljeni podaci koristit će se isključivo u znanstveno-istraživačke svrhe. Doktorska disertacija izrađena je u sklopu projekata Hrvatske zaklade za znanost: 'Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta tijekom razvoja u miša i čovjeka' i 'Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava (NEPHROGEN)', kojih je je voditeljica prof. dr. sc. Katarina Vukojević.

3.2. Prikupljanje uzoraka

3.2.1. Prikupljanje animalnih uzoraka

U kontroliranim temperaturnim uvjetima (23 ± 2 °C), *Dab1* heterozigotne životinje, generirane od tvrtke Jackson Laboratories, križane su do homozigotnosti. Također, uz navedene u istim uvjetima uzgajao se C57BL/6N (divlji) tip miševa u standardnim polikarbonatnim kavezima s neograničenim pristupom hrani i vodi, uz održavanje 12-satnog ciklusa dana i noći, te su na taj način minimalizirani svi okolišni čimbenici, a koji bi mogli imati utjecaj na rezultate istraživanja. U svakom kavezu su se nalazila najviše četiri miša. Koristili smo po najmanje 3 miša za svaki opisani genotip (*yotari* i divlji tip) u promatranom razvojnem periodu.

U gestacijskim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) gravidne mišice su žrtvovane, a njihovi embriji su bili pohranjeni. U postnatalnim grupama, miševi su se duboko anestetizirali pentobarbitalom i transkardijalno perfundirali PBS-om i 4% otopinom paraformaldehida (PFA) u 0.1 M PBS-a. Bubrezi su se nakon toga odstranili i fiksirali u 4% PFA u 0.1 M PBS preko noći.

Veličina uzorka određena je pomoću Meadove jednadžbe resursa, koja se često koristi za procjenu veličine uzoraka u istraživanjima na laboratorijskim životinjama i drugim eksperimentalnim studijama:

$$E = N - B - T \text{ odnosno } E + B + T = N$$

U našem istraživanju, parametri su definirani na sljedeći način:

N je ukupan broj eksperimentalnih jedinica (ukupno 26, dakle $N = 25$),

B je blokirajuća komponenta, koja predstavlja broj razvojnih stadija uključenih u istraživanje (5 stadija: E13.5, E15.5, P4, P11, P14) minus 1, dakle $B = 4$,

T je broj tretmana odnosno eksperimentalnih skupina (divlji tip i *yotari*), dakle 2 skupine minus 1, $T = 1$,

E predstavlja stupnjeve slobode pogreške, i u ovom slučaju iznosi $E = 20$

Ukupno:

$E + B + T = 20 + 4 + 1 = 25 \rightarrow$ odgovara uzorku od 12 divlji tip (wt) + 12 *yotari* životinja

Prema toj jednadžbi, minimalni broj životinja po skupini trebao bi biti 3. U ovom istraživanju, svaka eksperimentalna skupina sadržavala je između 3 i 7 životinja za svaki genotip i razvojni stadij, što potvrđuje da je uzorak bio dostatan za pouzdanu analizu.

3.2.2 Prikupljanje humanih uzoraka

Iz arhive Odjela za patologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split, prikupljeni su uzorci fetalnog bubrežnog tkiva i to 29 parafinskih blokova prikupljenih nakon spontanih i eugeničkih pobačaja uzrokovanih s životom nespojivih abnormalnosti fetusa, a s odobrenjem Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (klasa: 003-08/23-03/0015, broj odobrenja: 2181-198-03-04-23-0073) u skladu s načelima Helsinške deklaracije (117). Nakon preuzimanja parafinskih blokova, provedena je analiza uzoraka svjetlosnom mikroskopijom. Uzorci su prethodno obrađeni standardnim histološkim tehnikama kako bi se isključili svi macerirani uzorci tkiva. Gestacijska dob fetusa određena je mjerenjem udaljenosti od tjemena do trtice, uzimajući u obzir i podatke o posljednjoj menstruaciji majke (118). Patološke promjene bubrega klasificirane su na temelju makroskopske morfologije i rutinske histopatološke analize. Zbog

iznimne znanstvene vrijednosti, ali i ograničene dostupnosti materijala, ova arhivska zbirka predstavlja dragocjen izvor, iako s ograničenim brojem uzoraka (Tablica 2).

Tablica 2. Humani uzorci bubrega (n = 29) analizirani u istraživanju.

Razvojni tjedni	Ukupan broj uzoraka bubrega	Bubrežna patologija
18	4	Normalni bubrezi (CTRL)
22	1	
27	2	
30	2	
35	2	
37	1	
38	1	
22	1	Potkovičasti bubrezi (HK)
30	1	
35	1	
22	2	Displastični bubrezi (DYS)
27	1	
35	1	
37	2	
22	1	Bubrezi s udvostručenim ureterom (DU)
24	1	
30	1	
22	1	Hipoplastični bubrezi (HYP)
27	1	
37	1	
38	1	

Veličina uzorka humanih bubrega određena je pomoću gore navedene Meadove jednadžbe resursa:

$$E = N - (B + T + 1)$$

Parametri za ovu analizu određeni su kako slijedi:

N je ukupan broj pojedinaca ili jedinica u studiji: 29

B je blokirajuća komponenta (broj ispitivanih razvojnih tjedana umanjen za 1): $8 - 1 = 7$

T je komponenta liječenja, koja odgovara broju tretiranih skupina (uključujući kontrolnu skupinu) umanjenom za 1: $5 - 1 = 4$

Dobivena vrijednost za komponentu pogreške iznosi:

$$E = 29 - (7 + 4 + 1) = 17, \text{ što se nalazi unutar preporučenog raspona od 10 do 20.}$$

Prema navedenoj jednadžbi, korištenje 29 uzoraka osigurava dovoljnu snagu analize. Svaka ispitivana skupina sadržavala je minimalno 3 uzorka, što potvrđuje adekvatnost uzorka za statističku obradu.

3.3. Postupci obrade uzoraka

3.3.1. Uspostavljanje kolonije DAB1 knock-out (*yotari*) miševa i prikupljanje uzoraka

DNA uzorak potreban za PCR genotipizaciju se izolirao iz tkiva repa životinja prema uputama iz protokola Qiagen kita, kako bi se odredili genotipovi pokusnih životinja. Za PCR analizu su se koristili sljedeće početnice: *yotari* - GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CAGTGAGTACATATTGTGTGAGTTCC, divlji tip - GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CCTTGTTTCTTTGCTTTAAGGCTGT.

3.3.2. Priprema tkiva bubrega za histološku analizu:

Nakon fiksacije preko noći, tkivo bubrega i mišji embriji su se dehidrirali u uzlaznoj seriji otopina etanola (25%, 50%, 75%, 96%, 100%) i ksilena, a potom uklopili u parafinske blokove. Mikrotomom su se izrezali na 5 µm debele rezove i zalijepili na predmetna stakalca. Potom je slijedio obrnuti proces deparafinizacije u ksilenu (3 x 5 minuta), te rehidracija u silaznoj seriji otopina etanola (100%, 96%, 70%) i ispiranje u vodi.

3.3.3. Hematoksilin-eozin bojanje

Bojanje hematoksilin-eozinom (HE) predstavlja temeljnu histološku tehniku zbog svoje tehničke jednostavnosti i sposobnosti jasnog prikaza različitih tkivnih struktura. Hematoksilin oboji jezgre stanica u plavu nijansu, omogućujući dobru vidljivost jezgrinih detalja i ostalih kiselih komponenti. Eozin, s druge strane, nijansama crvene boje oboji citoplazmu, eritrocite, mišićno i vezivno tkivo, ovisno o njihovom kemijskom sastavu.

Nakon deparafiniziranja i rehidriranja uzorci se inkubiraju u otopini Meyerova hematoksilina u trajanju od 10 minuta, te se ispiru u običnoj mlakoj vodi. Potom se prebacuju u otopinu eozina na par minuta (~ 5 minuta), dehidriraju serijom rastućih etanola i ksilenom, uklapaju u Canada balzam, prekrivaju pokrovnim stakalcem, te proučavaju svjetlosnim mikroskopom kako bi se mogla potvrditi prethodno postavljena dijagnoza i procijeniti očuvanost tkiva prije imunofluorescejnog bojanja (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

3.3.4. Imunofluorescejinsko bojanje

Nakon deparafinizacije u ksilolu te postupne rehidracije u etanolu i destiliranoj vodi, uzorci su podvrgnuti kuhanju u citratnom puferu (pH 6,2) tijekom 30 minuta u kuhalu na paru radi otkrivanja antigena. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, slijedilo je ispiranje radnim PBS-om, odvajanje područja bojanja PAP olovkom te inkubacija u trajanju od 20 minuta s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezanja (Protein Block). Uzorci su potom inkubirani preko noći s primarnim protutijelima u vlažnoj komori (Tablica 3). Nakon ispiranja PBS-om nanose se sekundarna protutijela (Tablica 3), a zatim se uzorci inkubiraju jedan sat u mraku, također u vlažnoj komori. Nakon ispiranja PBS-om, na uzorke je nanesen DAPI za bojanje jezgara u trajanju od jedne minute. Na kraju, uzorci su montirani u Immu-Mount medij i prekriveni pokrovnim stakalcem.

Tablica 3. Primarna i sekundarna protutijela korištena u indirektoj imunofluorescenciji.

	Protutijelo	Kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna protutijela	Anti-LC3B	ab48394	kunić	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-GRP78	PA5-19503	kunić	1:300	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	Anti-HSC70	ab51052	kunić	1:50	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-LAMP2A	ab18528	kunić	1:100	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-A11	ab9234	kunić	1:200	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-AIF	ab140714	kunić	1:300	Abcam, Cambridge, UK
Sekundarna protutijela	Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488	711-545-152	magarac	1:400	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA
	Donkey Anti-Goat IgG, Alexa Fluor® 594	705-295-003	magarac	1:400	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA

3.3.5. Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju

Nakon dvostruke fiksacije u otopini koja sadrži 2% paraformaldehida (PFA) i 2,5% glutaraldehida (GA) u 0,1 M PBS-u te naknadnog ispiranja radnom PBS otopinom, uzorci bubrega pripremljeni su za elektronsku mikroskopiju prema standardnoj proceduri. Rezani su na vibratomu u rezove debljine 20 µm, permeabilizirani u 50% otopini etanola, a zatim isprani u PBS-u. Potom su dodatno fiksirani u 2% otopini osmij tetroksida tijekom dva sata, dehidrirani kroz seriju rastućih koncentracija etanola i uklopljeni u TAAB Epon 812 (TAAB, Reading, UK). Ultramikrotomom (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) rezani su ultratanki presjeci debljine 0,07 µm, koji su zatim kontrastirani pomoću 1% otopine uranil acetata i olovnog citrata. Na kraju su uzorci analizirani i fotografirani transmisijским elektronskim mikroskopom (JEM JEOL 1400, Japan).

3.3.6. Prikupljanje podataka i obrada mikrofotografija

Uzorci bubrega *Dab1^{-/-}* (yotari) i kontrolnih miševa u stadijima E13.5 i E15.5 te P4, P11 i P14, kao i humani fetalni bubrezi u razvoju te fetalni bubrezi pogođeni CAKUT-om, pregledani su fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX51, Tokyo, Japan) i snimani pri

povećanju $\times 40$ digitalnom kamerom (DP71, Olympus). Za kvantifikaciju imunoekspresije proteina od interesa, snimljeno je deset nepreklapajućih vidnih polja bubrežne kore pri povećanju $\times 40$ uz konstantno vrijeme ekspozicije. Snimljeno je najmanje deset mikrofotografija embrionalnih bubrežnih struktura: metanefrogenog mezoderma (mm), bubrežnih mjehurića (rv), nezrelih glomerula (g), zavijenih kanalića (Ct), ampula (A) i sabirnih cjevčica (Cd) u stadijima E13.5 i E15.5, te najmanje dvadeset mikrofotografija postnatalnih struktura: glomerula (G), PCT i DCT u P4, P11 i P14. Mikrofotografije mišjih uzoraka obrađene su i preklopljene korištenjem softvera Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA, USA), a analiza je provedena pomoću softvera ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Broj pozitivnih imunoreaktivnih stanica na LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A, AIF i A11 u svakoj strukturi od interesa je izbrojan, izražen kao postotak te uprosječen unutar svake životinjske skupine. Bilo koja razina citoplazmatskog, jezgrenog ili membranskog bojanja smatrana je pozitivnom. Kvalitativna analiza intenziteta bojanja određena je semikvantitativno i organizirana u četiri kategorije: odsutnost bojanja (-), blago bojanje (+), umjereno bojanje (++) i jako bojanje (+++).

Mikrofotografije kore (nefrogene zone i jukstamedularne regije) humanih fetalnih kontrolnih bubrega u razvoju te fetalnih bubrega s CAKUT fenotipovima obrađene su pomoću softvera ImageJ s ciljem kvantitativne procjene stanične imunoreaktivnosti. Slike su pripremljene za analizu uklanjanjem crvenog kanala s izvorne mikrofotografije zelenog fluorescencijskog signala korištenjem naredbi *split channels* i *image calculator*. U svrhu dobivanja kvantitativnih podataka, provedeno je oduzimanje srednjeg filtra s polumjerom od 2.0 piksela, određivanje praga metodom granične vrijednosti *triangle* te analiza površine korištenjem funkcije *analyze particles*, čime je izračunat postotak površine presjeka prekrivene pozitivnim signalom. Dobivene vrijednosti uprosječene su po skupinama. S obzirom na moguće varijacije među ispitivačima, tri stručna histologa neovisno su analizirala snimljene mikrofotografije, postavljajući granične vrijednosti pozadine temeljem negativnih kontrolnih mikrofotografija. Podudarnost između ocjenjivača potvrđena je analizom međurazredne korelacije, koja je pokazala koeficijent veći od 0.8, što ukazuje na izvrsno slaganje rezultata.

Slike su za potrebe prezentacije sastavljene u softveru Adobe Photoshop. Mikrofotografije su dodatno obrađene oduzimanjem pozadine pomoću naredbi *split channels* i

image calculator kako bi se minimalizirao prijelaz fluorescencijskog signala iz crvenog u zeleni kanal, te su dodatno prilagođene funkcijama *brightness* i *contrast*.

3.2.1. Statistički postupci

Za statističku analizu uzoraka korišten je softver GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistička značajnost definirana je na razini $P < 0,05$, dok su svi intervali pouzdanosti (CI) postavljeni na 95%. Kvantitativna analiza mišjih uzoraka provedena je pomoću dvofaktorske analize varijance (Two-Way ANOVA) uz Tukeyjev post hoc test. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti s pripadajućim međukvartilnim rasponom. Za provjeru normalne raspodjele podataka dobivenih iz ljudskih uzoraka primijenjen je Shapiro–Wilkov test. Svaki skup podataka vezan uz analizu postotka površine imunoreaktivnosti prikazan je pomoću P -vrijednosti ($P < 0,05$) kao kriterij statističke značajnosti te analiziran kroz F -distribuciju, $F(DFn, Dfd)$, gdje DFn označava brojnik stupnjeva slobode, a Dfd nazivnik stupnjeva slobode. Postotak pozitivnih stanica izražen je kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

Za analizu dinamike ekspresije proučavanih proteina kroz različita razvojna razdoblja korišteni su linearni i nelinearni regresijski modeli. Koeficijenti modela prikazani su kao procijenjene vrijednosti $\pm$ standardna pogreška, dok je koeficijent determinacije (R^2) korišten kao mjera kvalitete prilagodbe modela. Linearni trend prikazan je nagibom pravca regresije (β). Svi grafovi prikazani u ovoj disertaciji izrađeni su pomoću navedenog statističkog softvera.

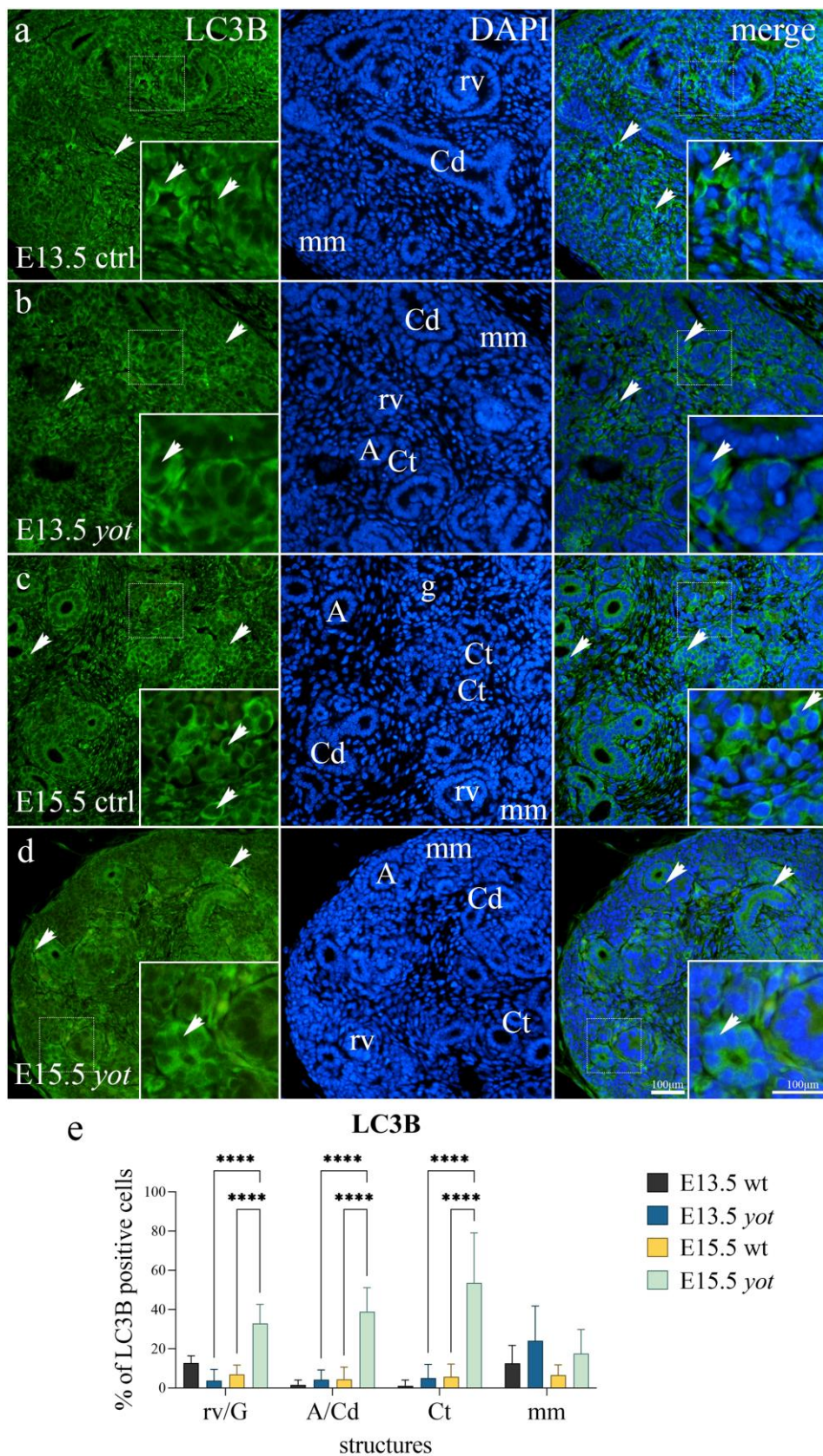
4. REZULTATI

U ovom dijelu disertacije prikazani su rezultati istraživanja provedenog na animalnim i humanim uzorcima s ciljem analize uloge autofagije i apoptoze tijekom normalnog razvoja bubrega te u kontekstu patoloških promjena. Na animalnim uzorcima, obuhvaćenima u različitim razvojnim stadijima (E13.5, E15.5, P4, P11 i P14), analiziran je izražaj ključnih markera autofagije – LC3B, GRP78, HSC70 i LAMP2A – kako bi se odredio stupanj aktivacije autofagnog puta. Uz to su ispitivani i markeri apoptoze – A11 i AIF – s ciljem utvrđivanja moguće povezanosti i međudjelovanja između autofagije i apoptoze, dvaju procesa ključnih za održavanje stanične homeostaze tijekom razvoja organa. Na humanim fetalnim uzorcima bubrega, koji su uključivali kontrolne uzorke u fiziološkom razvoju te uzorke bubrega pogođenih CAKUT fenotipovima, fokus istraživanja bio je isključivo na izražaju markera autofagije. Analizirani su isti markeri autofagije kao i u animalnim modelima, kako bi se procijenila prisutnost i distribucija autofagnog odgovora u zdravim i patološkim razvojnim stanjima bubrega. Cilj ove analize bio je utvrditi postoji li odstupanje u ekspresiji markera autofagije u kontekstu kongenitalnih anomalija mokraćnog sustava, što bi moglo ukazivati na disfunkcionalnu staničnu regulaciju u ranim fazama nefrogeneze.

4.1. Rezultati studije na životinjskim uzorcima

4.1.1. Izražaj LC3B u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

U E13.5 wt miševa zabilježen je blagi difuzni signal u bubrežnim mjehurićima, ali slabiji u sabirnim cjevčicama, uključujući ampule, mokraćovodne pupoljke i zavijene kanaliće. U okolnim nediferenciranim stanicama metanferogenog mezoderma (intersticija) uočena je blaga punktiformna ekspresija LC3B, čiji signal slabi prema diferenciranim strukturama bubrega (Slika 8a). U E13.5 *yotari* miševa nije zabilježena reaktivnost u bubrežnim mjehurićima, ampulama/zavijenim kanalićima niti u sabirnim cjevčicama, ali je signal LC3B zabilježen u stanicama metanefrogenog mezoderma, i to u nediferenciranim i diferenciranim stanicama (Slika 8b). U usporedbi s wt, LC3B signal u mm bio je jači i na periferiji i između drugih struktura, ali bez statističke značajnosti ($P = 0.661$).



Slika 8. Imunofluorescencijsko bojanje bubrega u razvoju divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) miševa s markerom LC3B i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt)

korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije LC3B u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv), glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim cjevčicama (Cd), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (e) prikazuje raspodjelu postotka LC3B-pozitivnih stanica u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct) te ampulama (A) ili sabirnim cjevčicama (Cd) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset podstruktura.

Obrazac LC3B signala u bubrezima u stadiju E15.5 kod wt miševa bio je u potpunosti različit u odnosu na E13.5. Visceralne stanice razvijajućih glomerula u kontrolnoj skupini pokazivale su slab punktiiformni LC3B signal. U ostalim strukturama, zavijeni kanalići te ampule/sabirne cjevčice pokazivale su također slab punktiiformni signal na apikalnoj membrani. Stanice metanefrogenog mezoderma koje okružuju sabirne cjevčice iskazivale su pretežno difuznu LC3B ekspresiju, dok je obrazac bio obrnut u perifernom dijelu (Slika 8c). Kod E15.5 *yotari* miševa zabilježen je znatno jači LC3B signal s nešto drugačijim obrascem. U glomerulima je bio prisutan snažan difuzan signal u visceralnim stanicama, kao i u parijetalnom sloju Bowmanove kapsule. Punktiiformni signal zavijenih kanalića i ampula/sabirnih cjevčica koji je bio prisutan u wt, zamijenjen je snažnim difuznim signalom apikalne membrane navedenih struktura. Signal u metanefrogenom mezodermu nije se povećao (Slika 8d). Postotak LC3B-pozitivnih stanica unutar svih analiziranih struktura, osim metanefrogenom mezoderma, bio je viši kod *yotari* miševa ($P < 0.05$).

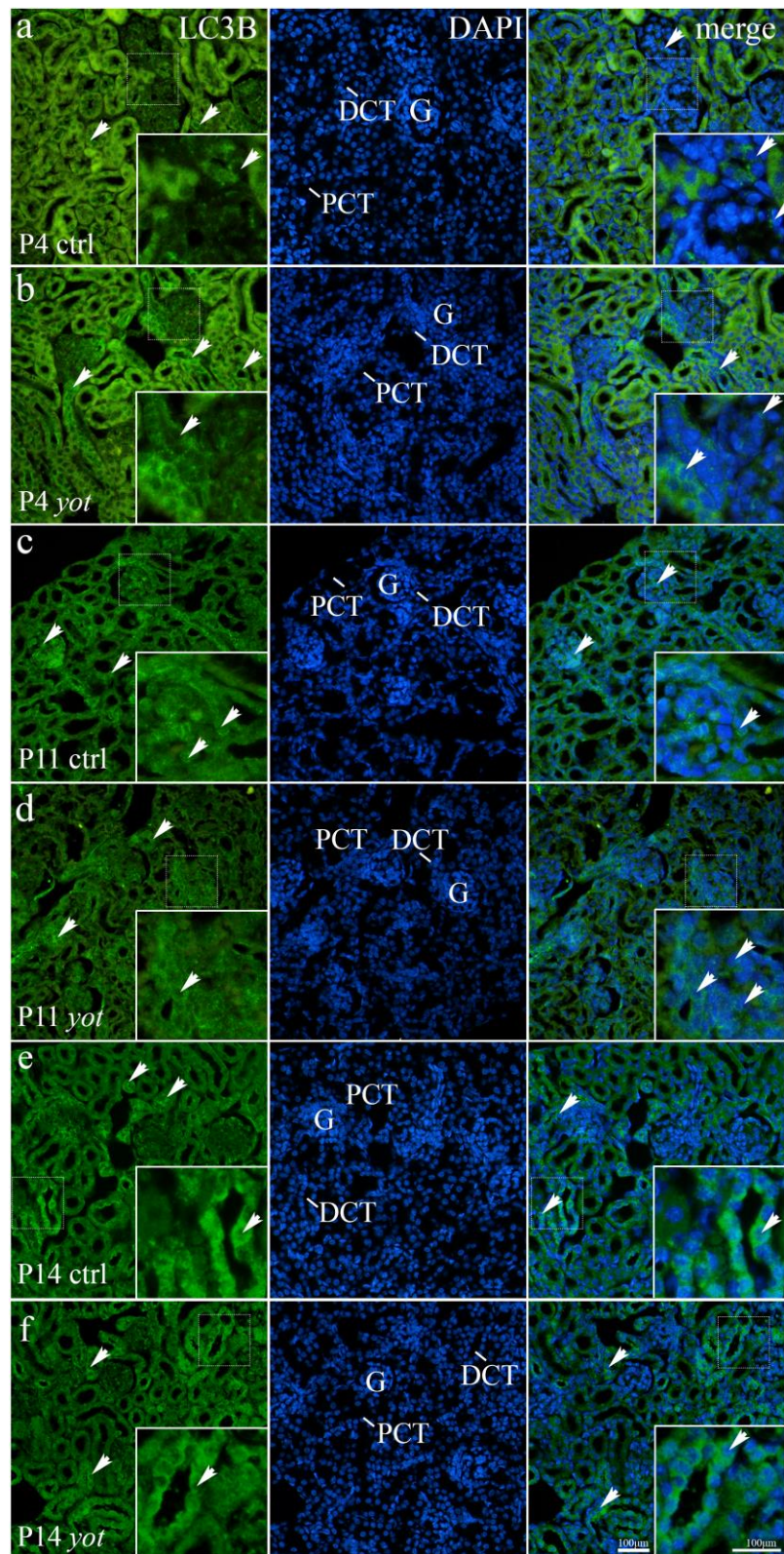
Semikvantitativna analiza oba životinjska genotipa u stadiju E13.5 pokazala je bojanje u metanefrogenom mezodermu, s blagim intenzitetom kod wt miševa i umjerenim kod *yotari* miševa (Tablica 4). Za razliku od blage reaktivnosti u stanicama sabirnih cjevčica i zavijenih kanalića/ampula kod wt miševa, kod *yotari* miševa zabilježena je umjerena reaktivnost prema semikvantitativnoj analizi. Nadalje, bubrežni mjehurići kod *yotari* životinja pokazivali su blagu reaktivnost u stadiju E15.5 (Tablica 2).

Tablica 4. Semikvantitativno određen intenzitet bojanja specifičnih protutijela u bubrezima *yotari* i divljeg tipa miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5.

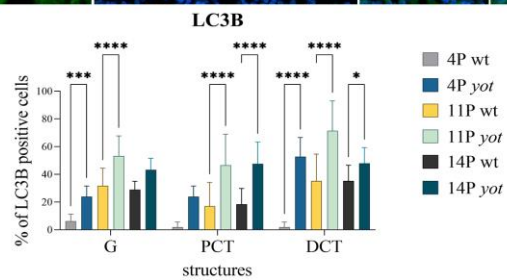
Embrionalni dan (E)	Životinja	Struktura	Protutijelo					
			Lc3b	Grp78	Hsc70	Lamp2a	A11	AIF
E13.5	divlji tip	mm	+	-	-	-	-/+	-
		rv/g	+	-	-	+	+	-
		Ct	-	-	-	+	+	-
		A/Cd	-	+++	-	-	-	-
	<i>yotari</i>	mm	++	++	+	-	+	+
		rv/g	-	+	-	++	-/+	++
		Ct	-	++	-/+	-	+	-
		A/Cd	-	++	-/+	-	-	+
E15.5	divlji tip	mm	-/+	-/+	-/+	-	-/+	-
		rv/g	-/+	-	-	+	-	+
		Ct	+	-	-	-	+	-
		A/Cd	+	+++	-	+	-	-
	<i>yotari</i>	mm	-/+	++	+	-	+++	-
		rv/g	+	++	-/+	+	-	++
		Ct	++	++	++	++	++	-
		A/Cd	++	+++	-	+	-	+

Analizirano je po 100 epitelnih i mezenhimskih stanica za svaki ispitivani uzorak. Intenzitet fluorescentnog signala vrednovan je prema sljedećoj skáli: +++ visok intenzitet, ++ umjeren intenzitet, + blagi intenzitet, – odsutnost signala; mm – metanefrogeni mezenhim, rv – bubrežni mjehurići, g – nezreli glomeruli, Ct – zavijeni kanalići, A – ampule, Cd – sabirni (odvodni) kanalići, E – dan embrionalnog razvoja.

Kod analize postnatalnih wt bubrega, uočeno je da stanice DCT pokazuju slab difuzni signal u citoplazmi, dok stanice PCT nisu pokazivale bojanje u P4. Većina signala bila je prisutna na apikalnoj membrani. U glomerulima je zabilježeno slabo difuzno citoplazmatsko bojanje u jukstaglomerularnom aparatu (JGA), uz slabi punktiiformni signal u endotelnim stanicama kapilarnih petlji (Slika 9a). Kod *yotari* miševa na dan P4, zabilježen je znatno veći postotak LC3B-pozitivnih stanica. Sve promatrane strukture pokazivale su znatno jače i difuznije signale (Slika 9b). U DCT je bojanje bilo prisutno na apikalnoj, ali i na bazolateralnoj membrani, dok je u PCT signal bio difuzno raspršen na apikalnoj strani ($P < 0.0001$). Glomeruli su pokazivali sličan uzorak kao kod wt, ali sa značajno jačim bojanjem u području JGA i endotelnih stanica krvnih žila ($P = 0.0004$).



g



Slika 9. Imunofluorescencijsko bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (a,c,e) i *yotari* (b,d,f) s markerom LC3B i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije LC3B u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (g) prikazuje raspodjelu postotka LC3B-pozitivnih stanica u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* genotipa tijekom vremena (P4, P11, P14). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je dvadeset podstruktura.

Značajno povećanje ekspresije LC3B zabilježeno je u postnatalnim bubrezima u kasnijim razvojnim fazama, P11 i P14. U oba navedena vremenska razdoblja, *yotari* miševi imali su značajno viši postotak pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom u glomerulima ($P < 0.05$), kao i u DCT i PCT ($P < 0.001$). U P11 i P14 kod *yotari* miševa uočeno je difuzno bojanje visceralnih stanica glomerula, uz snažan punktiformni signal u Bowmanovoj membrani i JGA. Dok je pak u zavijenim kanalićima, bojanje LC3B bilo punktiformno i raspršeno unutar citoplazme. Obrazac imunoizražaja bio je sličan i kod wt miševa, ali je većina stanica bila negativna na LC3B (Slika 9c–f).

Semikvantitativna analiza pokazala je blagu reaktivnost u glomerulima kod oba genotipa te umjerenu reaktivnost u PCT i DCT *yotari* miševa u četvrtom postnatalnom danu (P4). Intenzitet bojanja općenito je rastao u kasnijim razvojnim danima, s blagim bojanjem u glomerulima i DCT kod wt životinja u P11 te umjerenim bojanjem istih struktura kod *yotari*. Također, PCT je pokazao blagu reaktivnost signala kod mutiranih životinja. *Yotari* modeli su u P14 pokazali umjeren intenzitet bojanja u svim strukturama, za razliku od P14 wt miševa, kod kojih je obrazac bojanja bio jednak onome opaženom kod wt miševa jedanaestog dana postnatalnog razvoja (P11) (Tablica 3).

Tablica 5. Semikvantitativno određen intenzitet bojanja specifičnih protutijela u bubrezima *yotari* i divljeg tipa miševa u postnatalnim danima P4, P11, P14.

Postnatalni dan (P)	Životinja	Struktura	Protutijelo					
			Lc3b	Grp78	Hsc70	Lamp2a	A11	AIF
P4	divlji tip	G	+	+	-	-	-/+	+
		PCT	-	+	-	+	+	-
		DCT	-/+	-/+	-	-	+	-/+
	<i>yotari</i>	G	+	-	-	-	-/+	+
		PCT	++	++	-	+++	+	++
		DCT	++	++	+	+	++	++
P11	divlji tip	G	+	+	-/+	-/+	-	+
		PCT	-/+	+	-/+	-/+	+	+
		DCT	+	+	-/+	-	+	+
	<i>yotari</i>	G	+++	+	+	-/+	-	+
		PCT	+	+++	++	++	+	++
		DCT	+++	++	++	-	++	++
P14	divlji tip	G	+	+	-	-/+	-	-/+
		PCT	-	-	+	+	-/+	-/+
		DCT	+	+	-	-/+	+	-/+
	<i>yotari</i>	G	++	-/+	+	-	-	+
		PCT	++	++	+++	+++	+++	-/+
		DCT	++	++	+	+	++	-/+

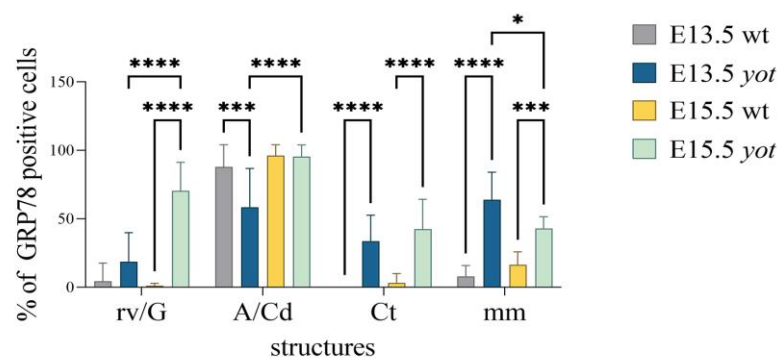
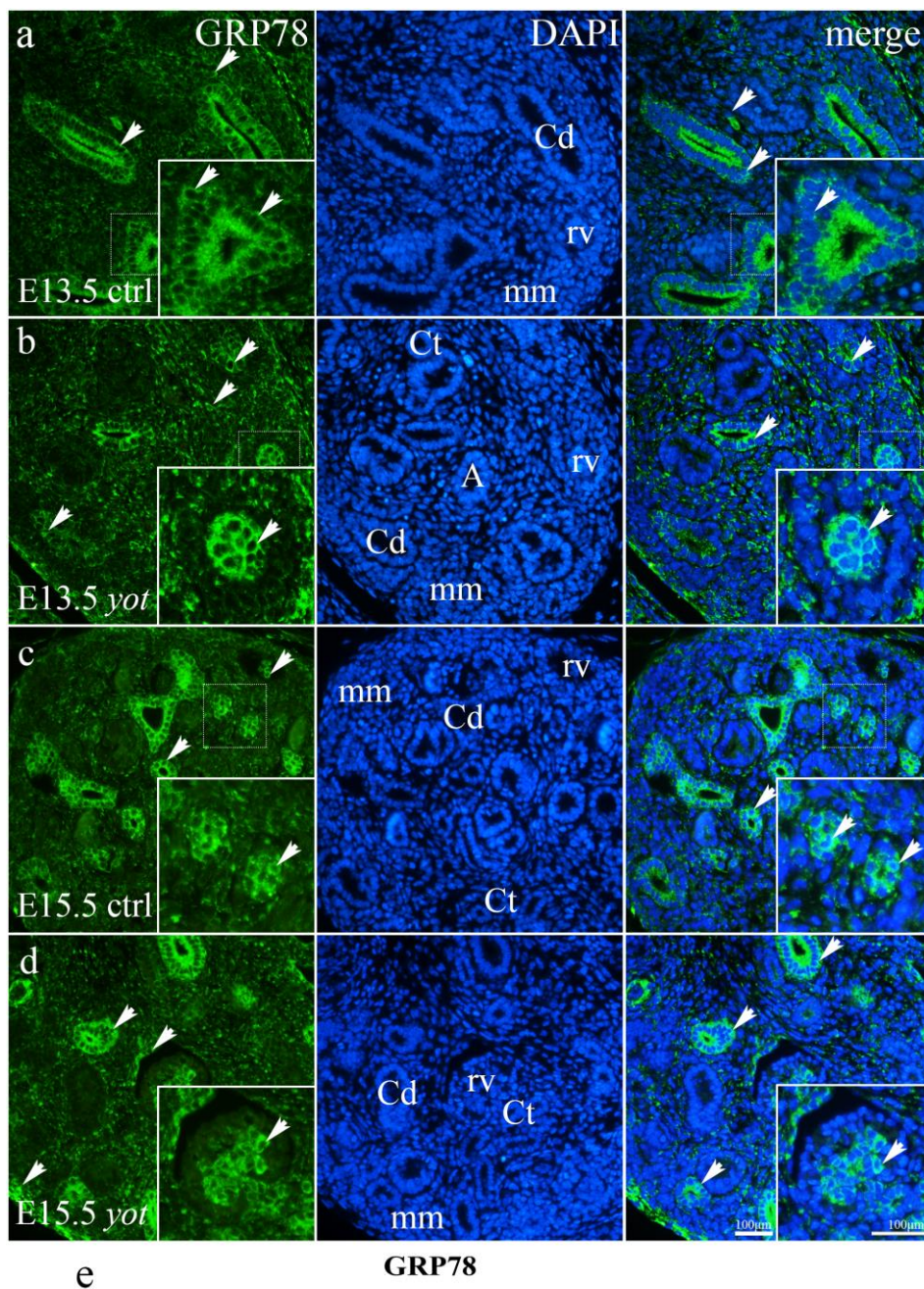
Analizirano je 20 bubrežnih struktura po svakom uzorku. Intenzitet fluorescentnog signala vrednovan je prema sljedećoj skali: +++ visok intenzitet, ++ umjeren intenzitet, + blagi intenzitet, – odsutnost signala; G - glomerul, PCT - proksimalni zavijeni kanalić, DCT- distalni zavijeni kanalić, P – dan postnatalnog razvoja.

4.1.2. Izražaj GRP78 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

U embrionalnom danu 13.5 (E13.5) oba genotipa pokazivala su pojačanu ekspresiju GRP78 u sabirnim kanalima i ampulama. U kontrolnih životinja bojanje je bilo jako i difuzno raspoređeno unutar citoplazme navedenih struktura, dok je kod mutiranih životinja signal bio pretežno lokaliziran na apikalnoj membrani (Slika 10a). U *yotari* miševa uočeno je jako točkasto bojanje u metanefrogenom mezenhimu, i to u nediferenciranim i diferencirajućim regijama. Renalni mjehurići i sabirni kanali pokazivali su blago točkasto bojanje, uglavnom koncentrirano u citoplazmi stanica, apikalno i bazolateralno (Slika 10b). Zabilježeno je nekoliko statistički značajnih rezultata za ovo razvojno razdoblje: kontrolna skupina imala je viši intenzitet signala u ampulama/sabirnim kanalima ($P = 0.0002$), dok je *yotari* pokazivao

znatno viši intenzitet u zavijenim kanalićima i mezenhimu ($P < 0.0001$). Semikvantitativna analiza pokazala je u E13.5 snažnu reaktivnost u ampulama i sabirnim kanalima divljeg tipa, dok je kod *yotari* miševa zabilježena blaga reaktivnost u glomerulima i umjerena reaktivnost u ostalim promatranim strukturama (Tablica 4).

Obrazac bojanja ostao je nepromijenjen i u E15.5, no *yotari* miševi pokazivali su znatno veće intenzitete signala u svim promatranim strukturama (Slika 3c,d). U ovoj fazi razvoja, glomeruli *yotari* životinja imali su znatno veći postotak GRP78-pozitivnih stanica u usporedbi s E13.5 ($P < 0.0001$). Što se tiče semikvantitativne analize, miševi divljeg tipa u E15.5 razvojnog periodu pokazivali su slabu reaktivnost u svim analiziranim strukturama, dok su strukture kod *yotari* miševa bile umjereno do jako pozitivne (Tablica 2).



Slika 10. Imunofluorescencijsko bojanje bubrega u razvoju divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) miševa s markerom GRP78 i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu

(*yotari* i *wt*) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije GRP78 u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv), glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim cjevčicama (Cd), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (e) prikazuje raspodjelu postotka GRP78-pozitivnih stanica u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct) te ampulama (A) ili sabirnim cjevčicama (Cd) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset podstruktura.

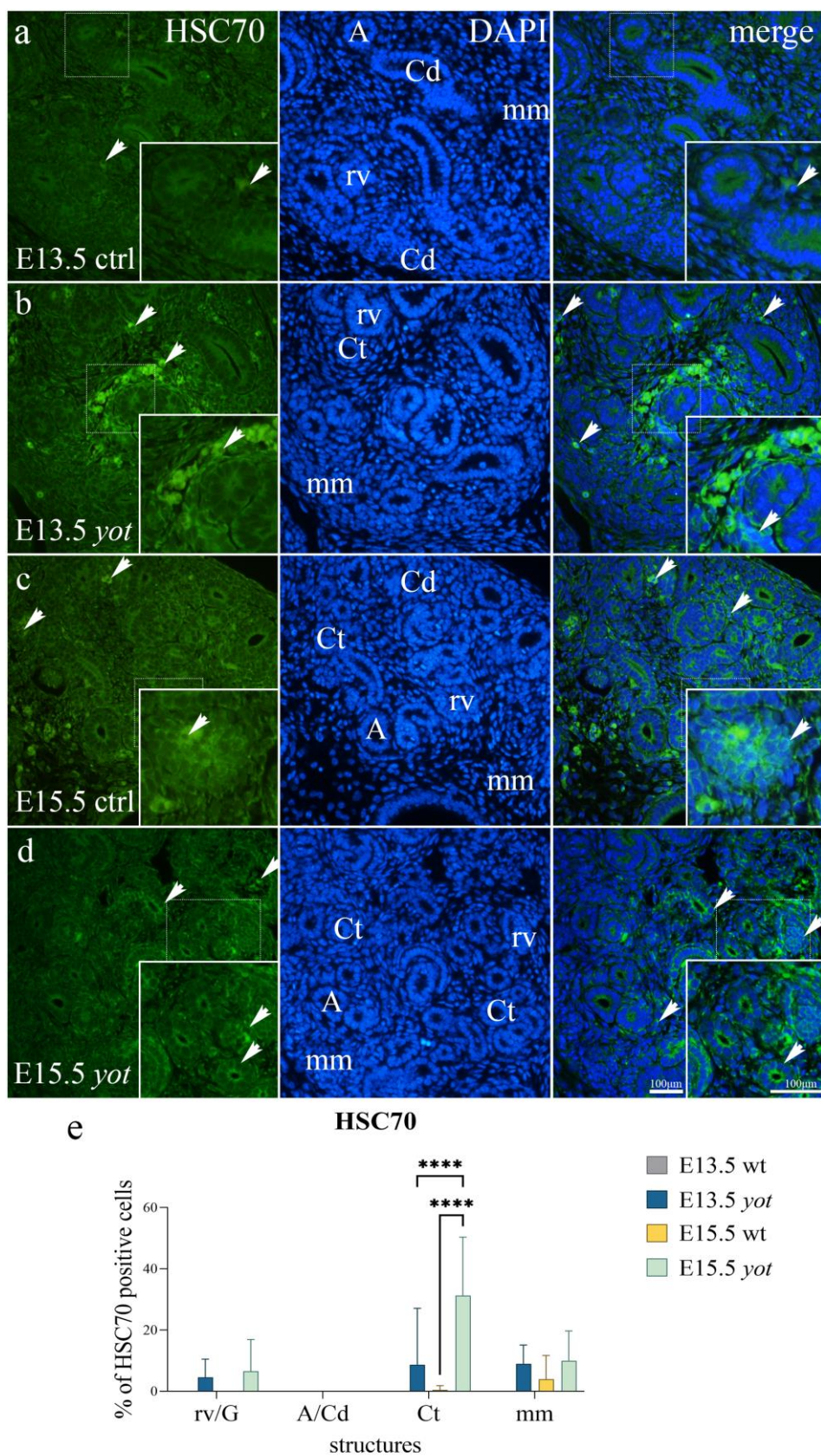
U postnatalnim stadijima razvoja, GRP78-pozitivne stanice pokazivale su snažan difuzan signal, prvenstveno u PCT i DCT. Kod životinja divljeg tipa imunoreaktivnost je bila prisutna u visceralnim stanicama glomerula, pri čemu je točkasti signal bio uglavnom lokaliziran unutar jezgre (Slika 11a,c). U kasnijim razvojnim fazama, bojanje glomerula postupno je slabilo te je gotovo potpuno izostalo do P14 (Slika 11e). Nasuprot tome, u zavijenim kanalićima zabilježen je suprotan obrazac, s postupnim i izraženim porastom intenziteta signala kroz vrijeme (Slika 11b,d,f). *Yotari* miševi pokazivali su značajno povećanje ekspresije u PCT i DCT u svim promatranim vremenskim točkama, pri čemu je signal bio dominantno lokaliziran u apikalnoj citoplazmi ovih struktura ($P < 0.0001$). U semikvantitativnoj analizi, miševi divljeg tipa četvrtog postnatalnog dana (P4) pokazivali su blago bojanje u glomerulima i PCT. Jedinke *yotari* genotipa iste dobi imale su umjeren intenzitet bojanja u kortikalnim tubulima. Jedanaestog dana postnatalnog razvoja (P11) kontrolna skupina pokazivala je slab signal u svim promatranim strukturama, dok su *yotari* miševi imali blagi intenzitet u glomerulima, ali umjeren do jak postotak pozitivnih stanica u PCT i DCT. Na kraju, kod P14 miševa divljeg tipa zabilježeno je blago bojanje u glomerulima i DCT, dok su zavijeni kanalići *yotari* miševa pokazivali umjeren intenzitet signala (Tablica 5).

Slika 11. Imunofluorescencijsko bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (a,c,e) i *yotari* (b,d,f) s markerom GRP78 i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije GRP78 u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (g) prikazuje raspodjelu postotka GRP78-pozitivnih stanica u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* genotipa tijekom vremena (P4, P11, P14). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je dvadeset podstruktura.

4.1.3. Izražaj HSC70 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

U analizi HSC70 tijekom embrionalne faze razvoja, fluorescencija je bila potpuno odsutna kod životinja divljeg tipa (Slika 12a–d). Kod *yotari* miševa tijekom E13.5 i E15.5 zabilježeno je slabi intenzitet HSC70-pozitivnih stanica, s blagom točkastom imunoreaktivnošću u citoplazmi stanica zavijenih kanalića i metanefrogenog mezenhima. Signal u zavijenim kanalićima *yotari* miševa pokazivao je sličan obrazac u oba embrionalna vremenska razdoblja, no statistički značajna razlika zabilježena je samo kod starijih jedinki ($P < 0.0001$). Iako je u intersticiju između diferencirajućih struktura bilo prisutno određeno točkasto bojanje, nije utvrđena značajna razlika između divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim fazama razvoja ($P = 0.064$).

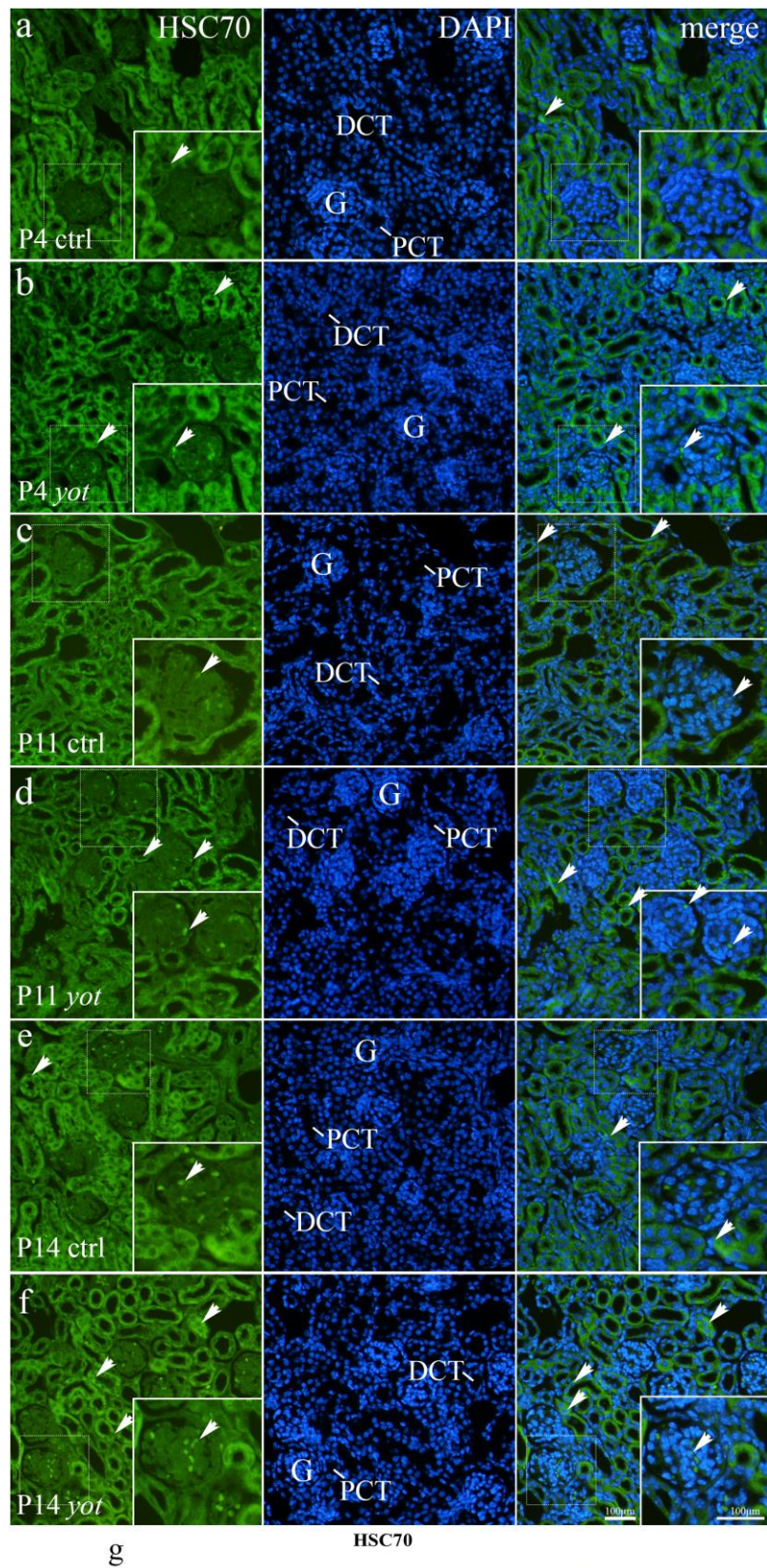
Semikvantitativna analiza *yotari* miševa u E15.5 pokazala je blagu do umjerenu reaktivnost u metanefrogenom mezenhimu i zavijenim kanalićima (Tablica 4).



Slika 12. Imunofluorescencijsko bojanje bubrega u razvoju divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) miševa s markerom HSC70 i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu

(*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije HSC70 u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv), glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim cjevčicama (Cd), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (e) prikazuje raspodjelu postotka HSC70-pozitivnih stanica u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct) te ampulama (A) ili sabirnim cjevčicama (Cd) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset podstruktura.

Što se tiče postnatalnih faza razvoja, isti obrazac bojanja nastavio se kod miševa divljeg tipa. Signal je bio potpuno odsutan; zabilježene su pojedinačne pozitivne HSC70 stanice, no ukupni postotak bio je zanemariv (Slika 13a,c,e). Međutim, obrazac je bio nešto drugačiji kod *yotari* miševa u usporedbi s embrionalnim uzorcima. Postotak pozitivnih HSC70 stanica postupno je rastao tijekom vremena, pri čemu je najjači signal bio prisutan u kortikalnim tubulima. Tijekom četvrtog postnatalnog dana (P4) signal je bio difuzan i uglavnom koncentriran na apikalnoj membrani DCT (Slika 13b). Kako su miševi rasli, tako je rastao i intenzitet signala HSC70; Tijekom P11, postotak pozitivnih stanica povećao se na oko 30% u tubulima svih ispitivanih životinja (Slika 6d). U PCT-u signal je bio raspršen kroz citoplazmu, dok je u DCT-u i dalje pretežno bio smješten na apikalnoj membrani. P11 glomeruli su također zabilježili fluorescenciju, većinom perinuklearno u visceralnim stanicama. Na 14. dan postnatalnog razvoja, bojanje HSC70 postiglo je svoj vrhunac. Oko 60% stanica PCT i DCT bile su pozitivne, s istim obrazcem distribucije signala kao kod P11 *yotari* miševa (Slika 13f). Što se tiče statističke analize, nije zabilježena značajna razlika u bojanju glomerula između kontrolne skupine i *yotari* miševa u nijednoj postnatalnoj fazi. Međutim, bili su prisutni značajni rezultati za druge strukture, kao što su PCT tijekom P11 ($P = 0.0023$) i P14 ($P < 0.0001$), te DCT tijekom P4 ($P = 0.035$), P11 ($P < 0.0001$) i P14 ($P < 0.0001$).



Slika 13. Imunofluorescencijsko bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (a,c,e) i *yotari* (b,d,f) s markerom HSC70 i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije HSC70 u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi $100\ \mu\text{m}$ i odnosi se na sve slike. Grafikon (g) prikazuje raspodjelu postotka HSC70-pozitivnih stanica u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* genotipa tijekom vremena (P4, P11, P14). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je dvadeset podstruktura.

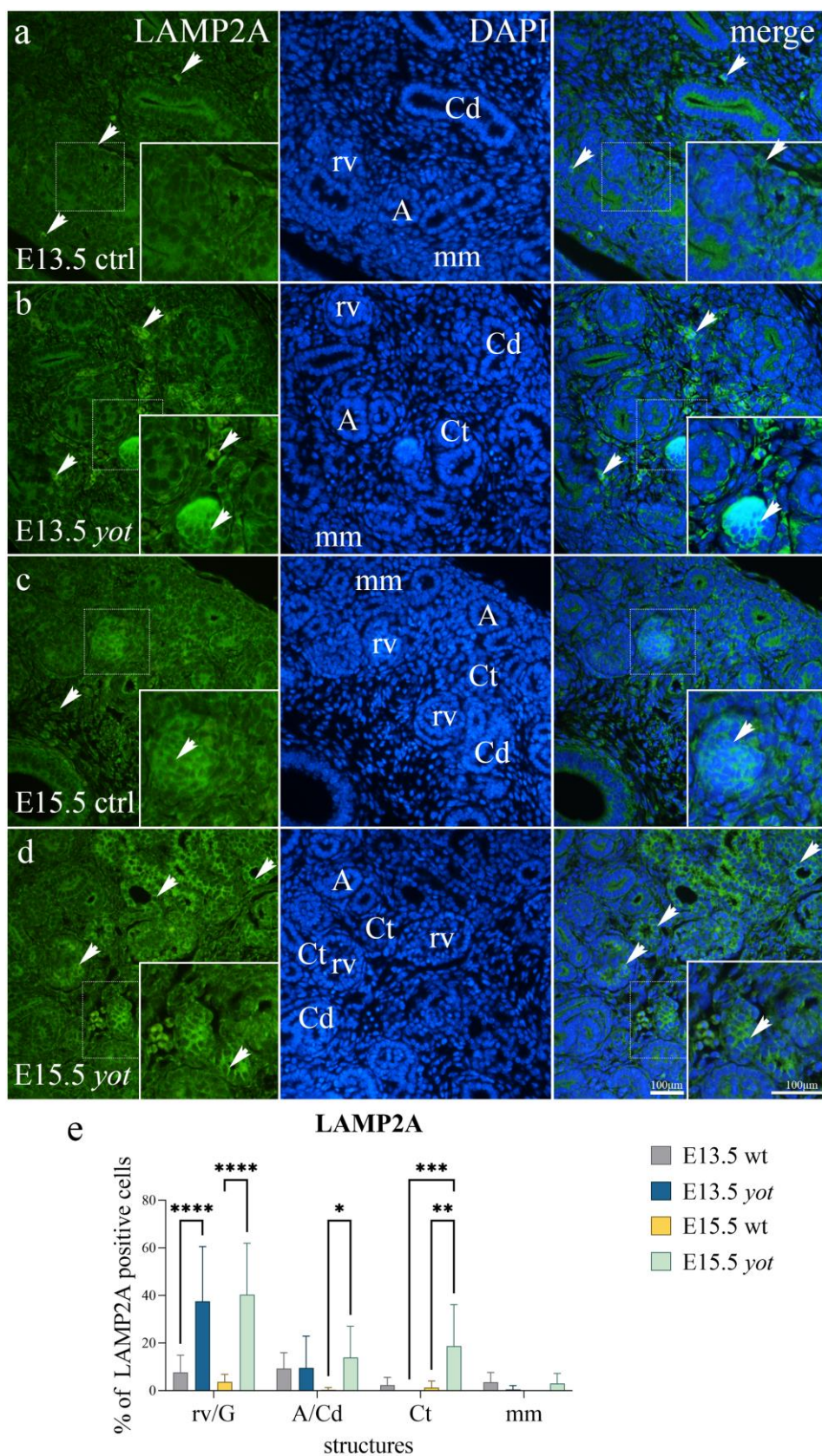
Na temelju semikvantitativne analize, životinje divljeg tipa pokazivale su minimalnu reaktivnost u PCT 14. dana postnatalnog razvoja. Uzorci *yotari* miševa pokazali su složeniji obrazac reaktivnosti; semikvantitativna analiza za P4 *yotari* otkrila je umjeren intenzitet signala u PCT i DCT. Na P11, intenzitet signala ostao je nepromijenjen u obje strukture, ali je u toj fazi zabilježena i blaga reaktivnost u stanicama glomerula. *Yotari* miševi tijekom P14 pokazali su jaku reaktivnost u PCT, te blagu u glomerulima i DCT (Tablica 4).

4.1.4. Izražaj LAMP2A u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

LAMP2A-pozitivne stanice bile su identificirane kao zeleno bojanje u embrionalnim fazama razvoja kod oba genotipa, wt i *yotari* miševa. Tijekom E13.5, sabirni kanali i ampule obje skupine pokazivale su slab intenzitet fluorescencije, pri čemu je bojanje bilo pretežno koncentrirano na apikalnoj membrani navedenih struktura (Slika 14a,b). Bubrežni mjehurići *yotari* životinja pokazali su jaču reaktivnost u ranijem razvojnem periodu, s bojanjem primarno koncentriranim perinuklearno ($P < 0.0001$). Kod E15.5 wt miševa, obrazac reaktivnosti ostao je nepromijenjen (Slika 14c), dok je kod *yotari* genotipa udio LAMP2A-pozitivnih stanica značajno varirao između E13.5 i E15.5 (Slika 14d). U nezrelim glomerulima i dalje je bio prisutan snažan difuzni signal perinuklearno, no najveće varijacije uočene su u zavijenim kanalićima. Citoplazma otprilike polovice analiziranih tubula pokazivala je snažno bojanje, koje je bilo ili točkasto ili difuzno. Statistička analiza pokazala je značajne razlike između dvaju

genotipova: imunoekspresija LAMP2A u glomerulima, sabirnim i zavijenim kanalićima bila je značajno veća kod *yotari* miševa tijekom E15.5 u usporedbi s wt uzorcima iste dobi ($P < 0.0001$).

Semikvantitativna analiza wt miševa tijekom E13.5 pokazala je blagi intenzitet bojanja u nezrelim glomerulima i zavijenim kanalićima. Uzorci *yotari* miševa iste dobi pokazali su umjeren intenzitet bojanja u bubrežnim mjehurićima. Na E15.5, divlji tip pokazivao je blagu reaktivnost u sabirnim kanalima i bubrežnim mjehurićima, dok su *yotari* uzorci imali istu razinu reaktivnosti u navedenim strukturama, ali su dodatno pokazivali i umjeren intenzitet bojanja u zavijenim kanalićima (Tablica 4).

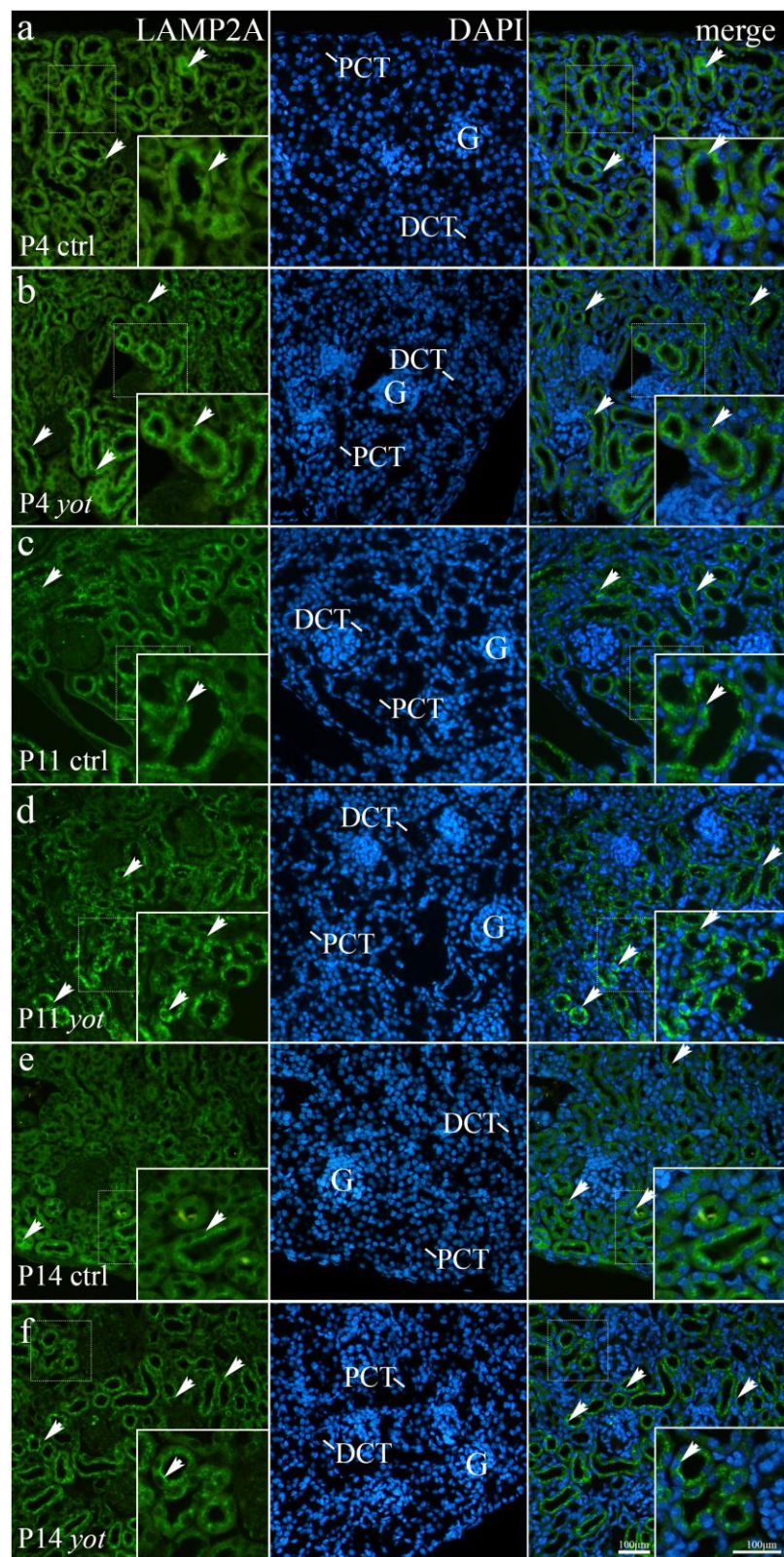


Slika 14. Imunofluorescencijsko bojanje bubrega u razvoju divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) miševa s markerom LAMP2A i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu

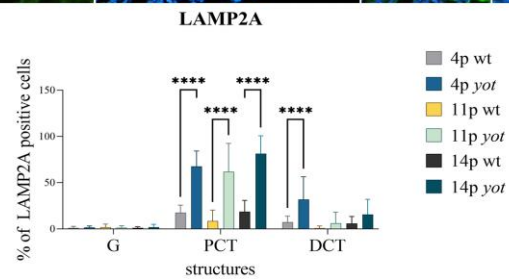
(*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije LAMP2A u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv), glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim cjevčicama (Cd), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (e) prikazuje raspodjelu postotka LAMP2A-pozitivnih stanica u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct) te ampulama (A) ili sabirnim cjevčicama (Cd) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset podstruktura.

Sličan obrazac zadržao se i u kasnijim postnatalnim fazama (P11 i P14), s manjim postotkom LAMP2A-pozitivnih stanica u DCT. Tijekom cijelog postnatalnog razvoja, preraspodjela signala na apikalnim membranama zavijenih kanalića ostala je nepromijenjena (Slika 15c–f). Statistički značajna razlika zabilježena je za PCT ($P < 0.0001$).

Semikvantitativna analiza pokazala je blago bojanje PCT-a kod wt miševa na P4; kod *yotari* jedinki iste dobi zabilježeno je blago bojanje DCT-a te snažno bojanje PCT-a. Tijekom P11, *yotari* su pokazivali umjeren intenzitet signala u PCT-u, koji je ostao nepromijenjen i četrnaestog postnatalnog dana (P14) za isti genotip, dok su P14 wt jedinke imale blagu reaktivnost u PCT-u (Tablica 5).



g

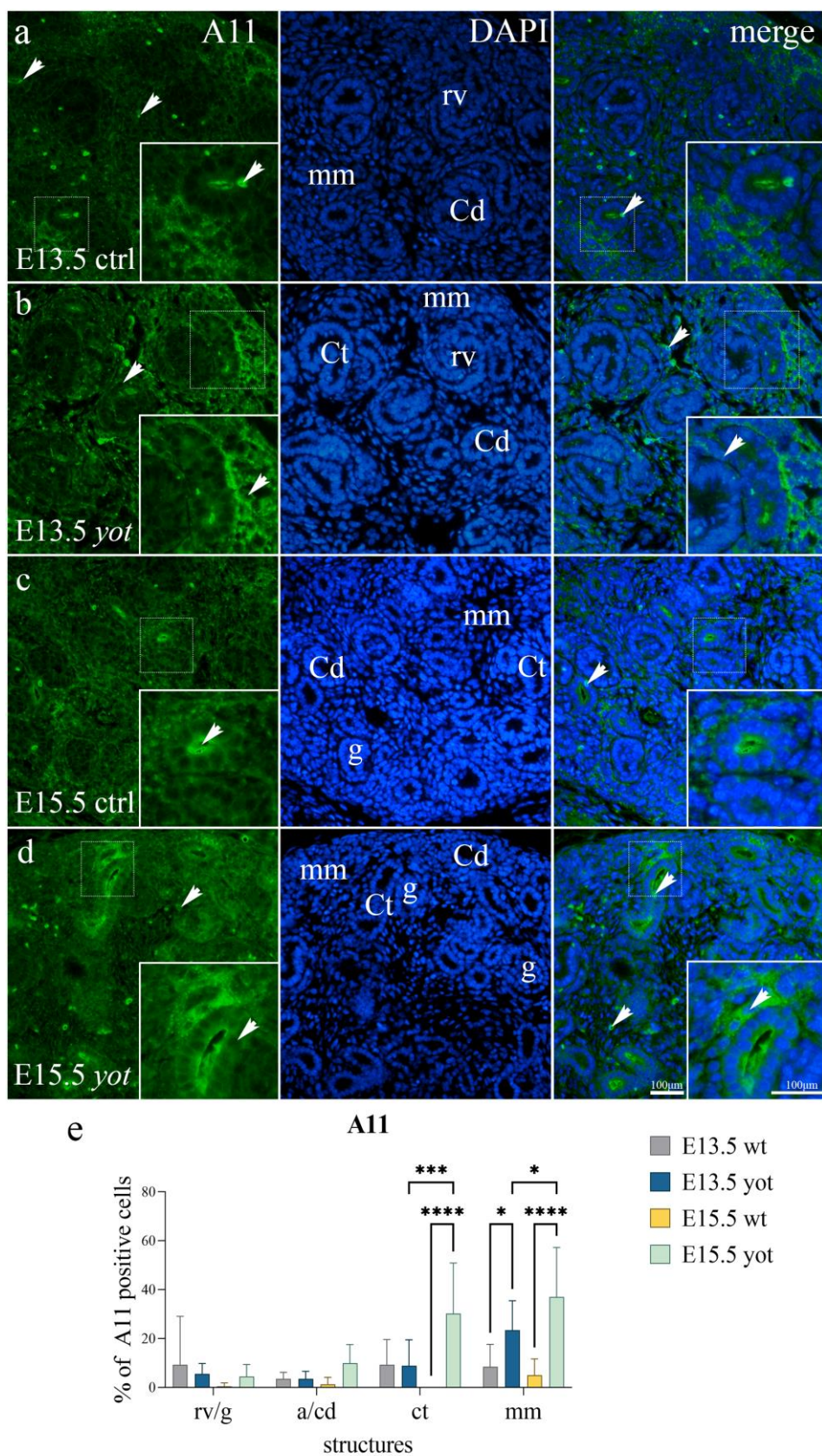


Slika 15. Imunofluorescencijsko bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (a,c,e) i *yotari* (b,d,f) s markerom LAMP2A i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije LAMP2A u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi $100\ \mu\text{m}$ i odnosi se na sve slike. Grafikon (g) prikazuje raspodjelu postotka LAMP2A-pozitivnih stanica u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* genotipa tijekom vremena (P4, P11, P14). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je dvadeset podstruktura.

4.1.5. Izražaj A11 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

U ranom embrionalnom razdoblju (E13.5) imunofluorescencijsko bojanje bilo je u većini analiziranih struktura odsutno kod oba genotipa, wt i *yotari*. Manja područja apikalne membrane zavijenih kanalića pokazivala su slab punktiformni signal (Slika 16a,b). Kod *yotari* miševa, metanefrogeni mezenhim pokazao je statistički značajno jače bojanje u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P = 0,0115$). S napredovanjem embrionalnog razvoja, *yotari* miševi pokazivali su sve izraženije bojanje apikalnih membrana zavijenih kanalića ($P < 0,0001$), kao i područja četkaste prevlake. Istovremeno, u perifernim dijelovima bubrega metanefrogeni mezenhim poprimio je difuzni uzorak imunofluorescencije, zamjenjujući početni punktiformni izgled ($P < 0,0001$) (Slika 16c,d).

Semikvantitativna analiza otkrila je blagi intenzitet bojanja metanefrogenog mezenhima kod *yotari* miševa na E13.5, koji se u kasnijoj embrionalnoj fazi intenzivirao do visokog stupnja. U istom razdoblju zabilježen je i umjeren signal u zavijenim kanalićima *yotari* miševa (Tablica 4).

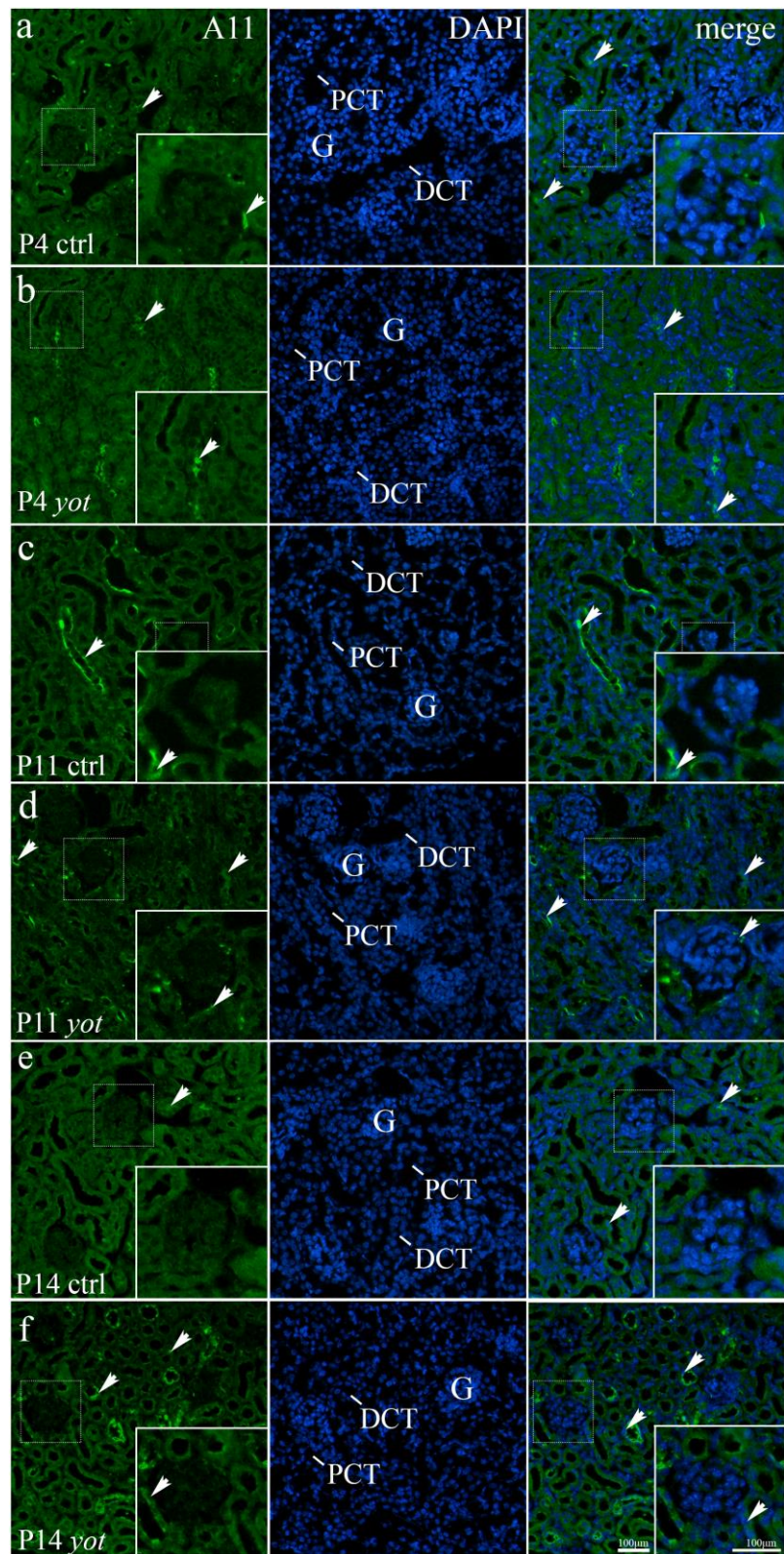


Slika 16. Imunofluorescencijsko bojanje bubrega u razvoju divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) miševa s markerom A11 i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari*

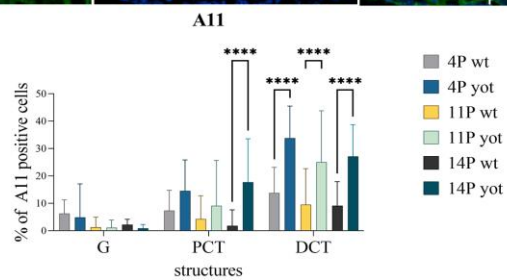
i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije A11 u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv), glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim cjevčicama (Cd), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (e) prikazuje raspodjelu postotka A11-pozitivnih stanica u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct) te ampulama (A) ili sabirnim cjevčicama (Cd) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$, ***** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset podstruktura.

Tijekom svih ispitivanih vremenskih točaka postnatalnog razdoblja, A11 signal bio je odsutan u bubrežnim tjelešcima i glomerulima. U pojedinim kontrolnim uzorcima zabilježena su manja područja bojanja Bowmanove membrane, no bez statističke značajnosti. Kod *yotari* miševa, s napredovanjem postnatalne dobi, bilježio se sve intenzivniji signal u apikalnoj membrani PCT, koji je dosegnuo vrhunac na P14, uz statistički značajnu razliku ($P < 0,0001$) (Slika 17f). DCT pokazivali su snažan signal u svim analiziranim postnatalnim razvojnim fazama kod *yotari* miševa, s difuznom raspodjelom signala u apikalnoj i bazolateralnoj membrani (Slika 17b,d,f), što je također bilo statistički značajno ($P < 0,0001$).

Semikvantitativna analiza otkrila je umjereno visok intenzitet bojanja DCT-a tijekom svih postnatalnih faza kod *yotari* miševa, dok je za PCT samo u P14 zabilježen visok intenzitet signala (Tablica 5).



g

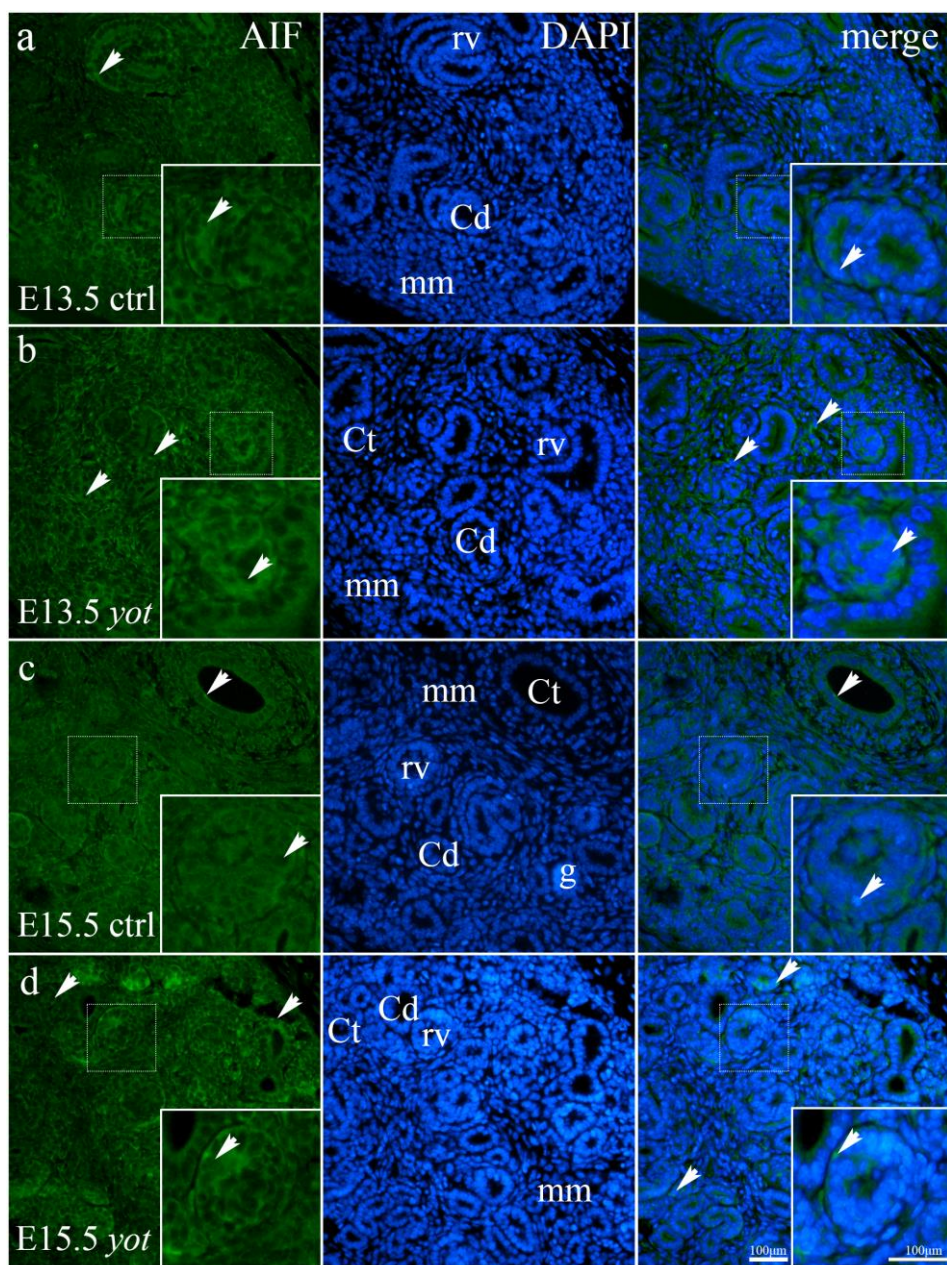


Slika 17. Imunofluorescencijsko bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (a,c,e) i *yotari* (b,d,f) s markerom A11 i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije A11 u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi $100\ \mu\text{m}$ i odnosi se na sve slike. Grafikon (g) prikazuje raspodjelu postotka A11-pozitivnih stanica u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* genotipa tijekom vremena (P4, P11, P14). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je dvadeset podstruktura.

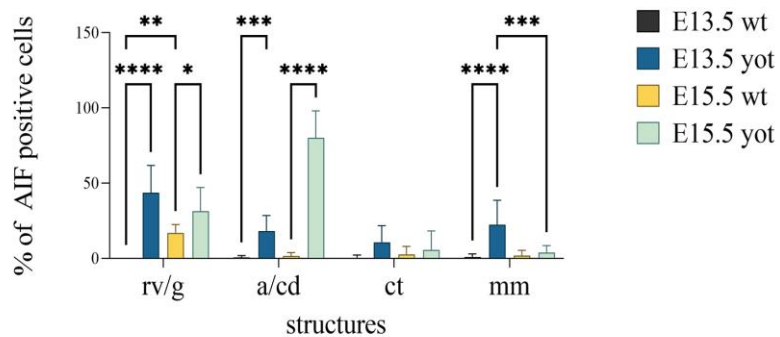
4.1.6. Izražaj AIF u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Tijekom svih analiziranih embrionalnih razvojnih stadija, *yotari* miševi su pokazivali statistički značajno povišen izražaj AIF-a u bubrežnim tjelešcima, s dominantnom perinuklearnom lokalizacijom signala. Važno je istaknuti da je sličan, iako slabiji, signal bio prisutan i u bubrežnim tjelešcima kontrolne skupine u kasnijem embrionalnom stadiju (Slika 18c), no izražaj je i dalje bio značajno intenzivniji u mutiranim jedinkama ($P = 0,0106$). Osim toga, u oba analizirana embrionalna stadija (E13.5 i E15.5), ampule i sabirni kanalići *yotari* miševa pokazivali su izražen signal pretežno lokaliziran u apikalnim dijelovima stanica (Slika 18b,d), uz statistički značajne razlike ($P = 0,0009$; $P < 0,0001$).

Semikvantitativna analiza ukazala je na umjereno visok intenzitet signala u bubrežnim tjelešcima i glomerulima kod *yotari* miševa u oba embrionalna razdoblja, dok je intenzitet signala u ampulama i sabirnim kanalićima bio blag (Tablica 4).



AIF

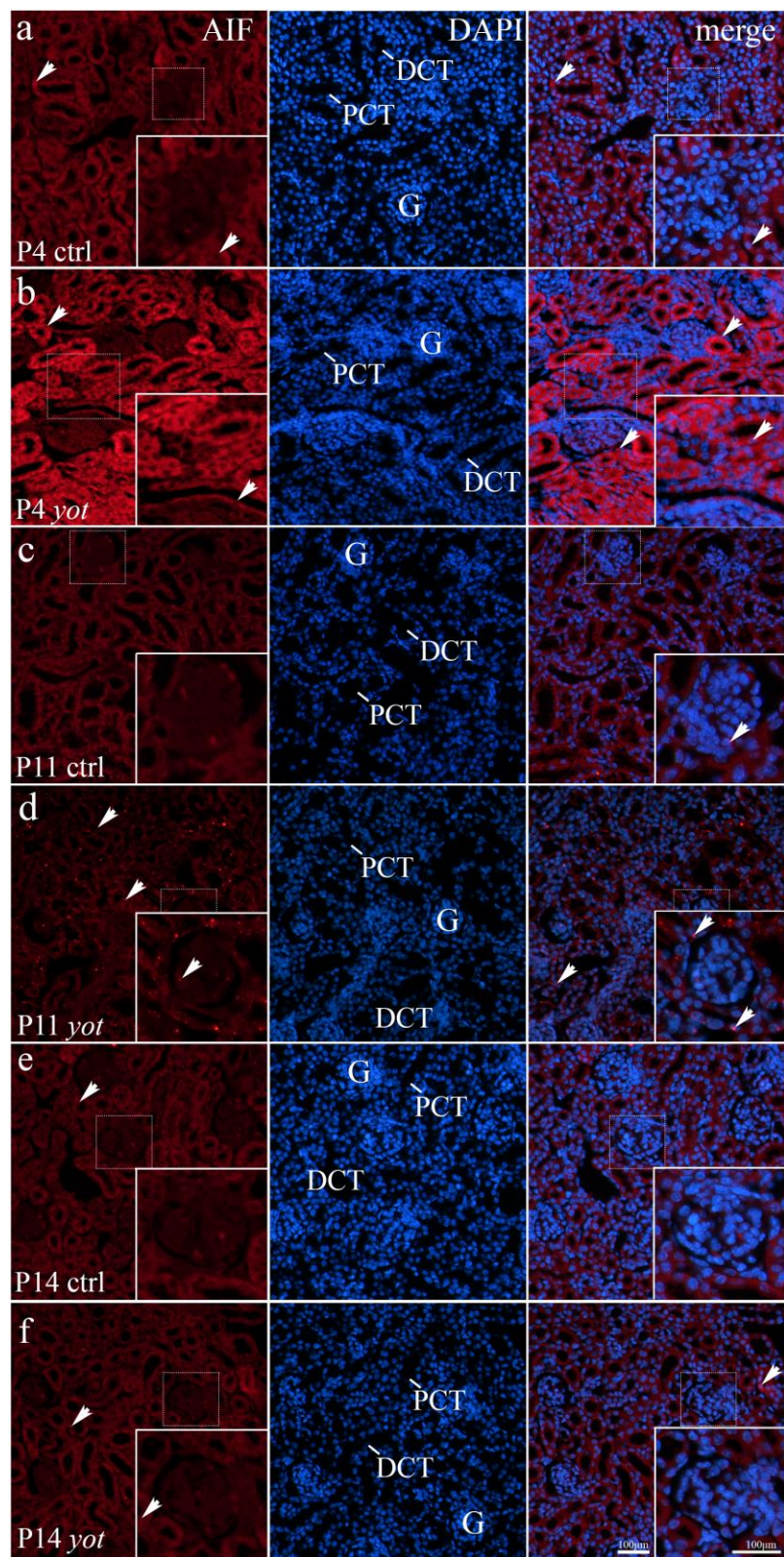


Slika 18. Imunofluorescencijsko bojanje bubrega u razvoju divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) miševa s markerom AIF i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari*

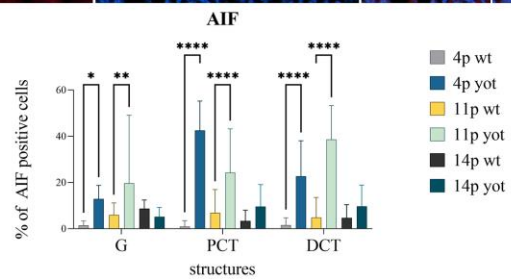
i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije AIF u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv), glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim cjevčicama (Cd), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (e) prikazuje raspodjelu postotka AIF-pozitivnih stanica u metanefrogenom mezodermu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (G), zavijenim kanalićima (Ct) te ampulama (A) ili sabirnim cjevčicama (Cd) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset podstruktura.

U postnatalnom razdoblju, mlade *yotari* jedinke (P4 i P11) pokazivale su statistički značajno pojačan signal u svim analiziranim bubrežnim strukturama. U glomerulima je signal bio slab, punktiiforman i većinom lokaliziran unutar citoplazme stanica (Slika 19d). U PCT signal se pokazivao kao difuzan, s prevladavajućom bazolateralnom lokalizacijom (Slika 19b), dok je u DCT bio punktiiforman i dominantno smješten u perinuklearnom području.

Semikvantitativna analiza potvrdila je umjereno jak intenzitet signala u PCT i DCT *yotari* jedinki u oba mlađa analizirana postnatalna stadija (Tablica 5).



g



Slika 19. Imunofluorescencijsko bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (a,c,e) i *yotari* (b,d,f) s markerom AIF i nuklearno bojanje s DAPI-em. Za svaku genotipsku skupinu (*yotari* i wt) korištena su po tri miša za svaki analizirani vremenski period. Strelice prikazuju obrasce ekspresije AIF u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT), označenima na DAPI slikama. Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (g) prikazuje raspodjelu postotka AIF-pozitivnih stanica u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* genotipa tijekom vremena (P4, P11, P14). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte) i analizirani pomoću Two-way ANOVA testa s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, **** $P < 0.00001$. Za svaki vremenski period analizirano je dvadeset podstruktura.

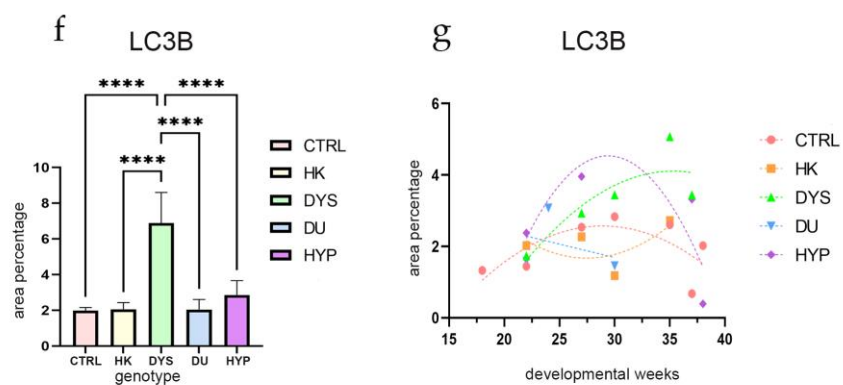
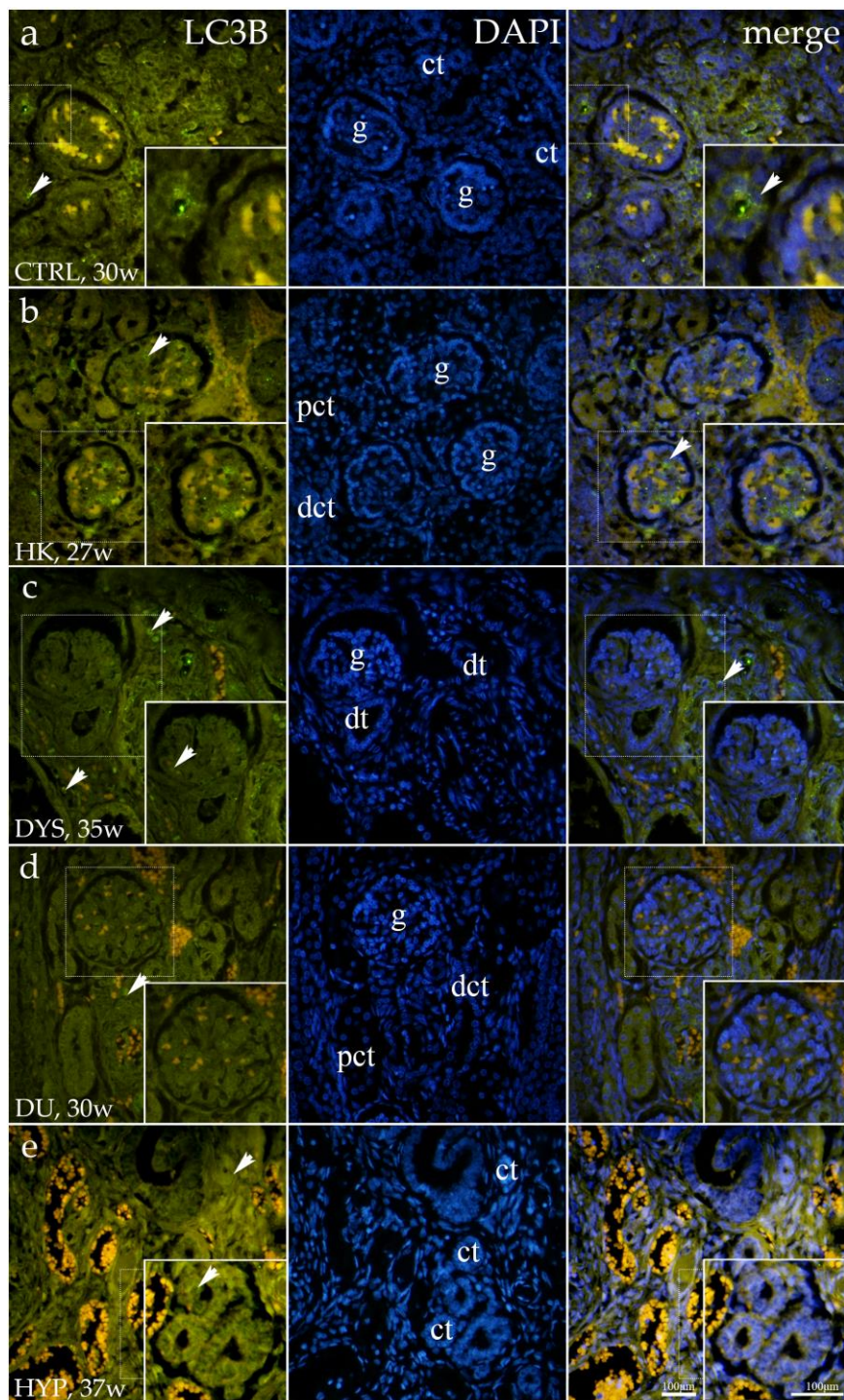
4.2. Rezultati studije na humanim uzorcima

4.2.1. Izražaj LC3B u fetalnim humanim bubrezima

Imunohistokemijsko bojanje LC3B u kontrolnoj skupini zdravih uzoraka bilo je neujednačeno među promatranim strukturama. Zavijeni tubuli u nefrogenoj zoni i jukstamedularnoj regiji pokazivali su blagu punktiformnu ekspresiju na apikalnim membranama. Visceralne stanice glomerula u razvoju imale su blagi, sporadični punktiformni signal, dok su parijetalne stanice Bowmanove kapsule bile bez imunoreaktivnosti (Slika 20a). Kod većine CAKUT fenotipova, HK, DU i HYP, uzorci su pokazivali sličan obrazac bojanja kao kontrolna skupina, pri čemu je signal najintenzivnije bio prisutan u visceralnim stanicama glomerula (Slika 20b,d,e). S druge strane, DYS su se prezentirali s jasno različitim obrascem bojanja, uključujući prethodno spomenuti sporadični signal u visceralnim stanicama glomerula, ali i u parijetalnim stanicama Bowmanove kapsule, kao i izraženo, difuzno, perinuklearno LC3B bojanje u stanicama DCT. Mezenhimske stanice koje okružuju zavijene tubule također su pokazivale slab punktiformni signal (Slika 20c).

Analizom je utvrđena značajna razlika u postotku područja LC3B-pozitivnih stanica među ispitivanim skupinama; DYS su imali najveći udio LC3B-pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom, HK, DU i HYP ($P < 0,0001$; Slika 20f).

U displastičnim bubrezima, udio LC3B-pozitivnih stanica s vremenom je rastao kvadratnim trendom ($R^2 = 75\%$). U ostalim fenotipovima broj pozitivnih stanica je opadao tijekom vremena. Od tih, samo DU je pokazao linearan trend opadanja ($R^2 = 87,9\%$, $\beta = -0,15 \pm 0,07$), dok su HYP, CTRL i HK imali negativne kvadratne trendove ($R^2 = 50\%$; $R^2 = 51\%$; $R^2 = 63\%$; Slika 20g).



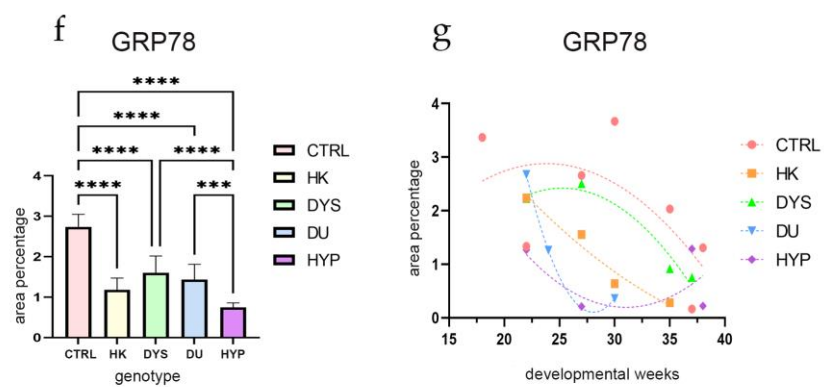
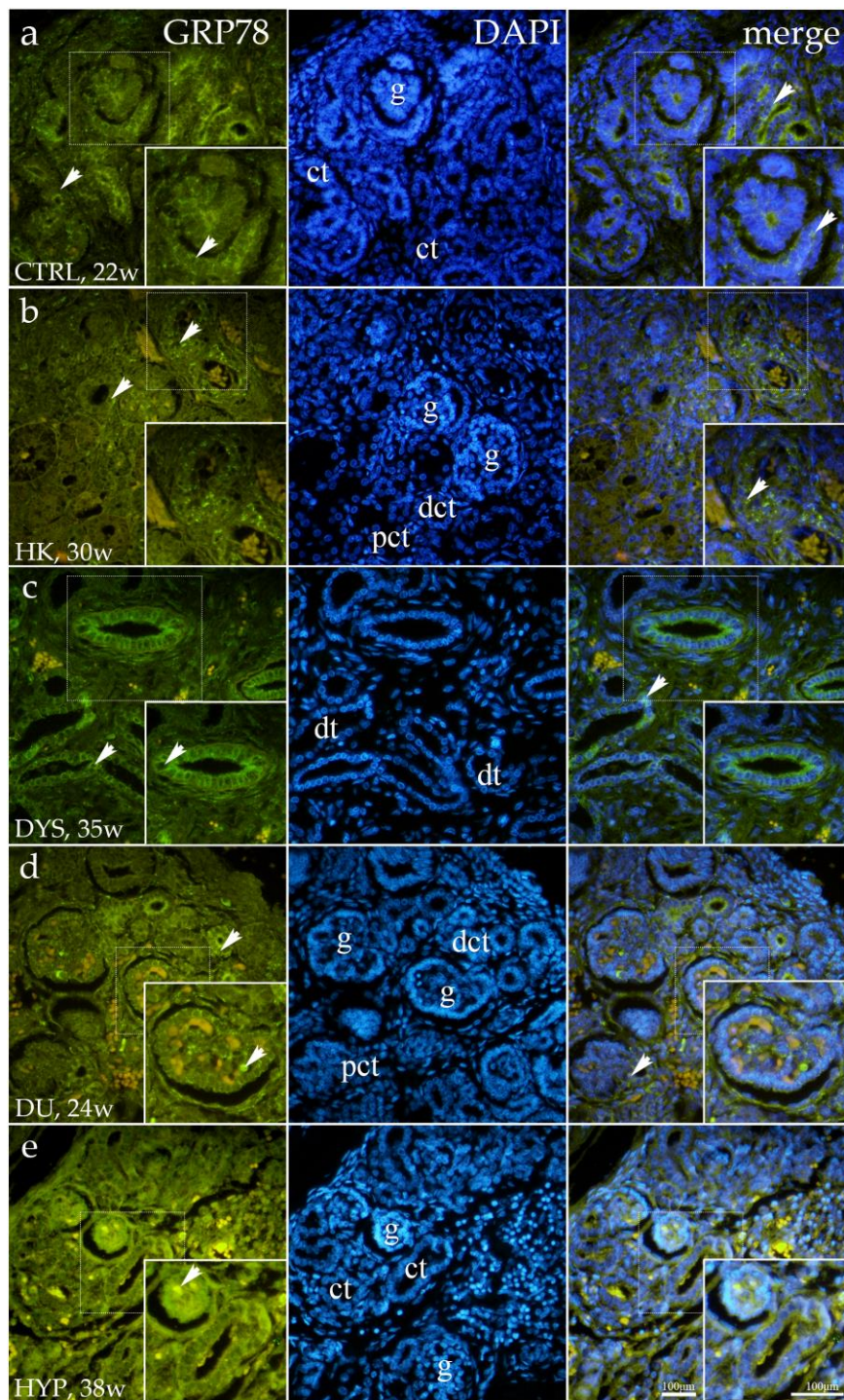
Slika 20. Imunofluorescencijsko bojanje fetalnih humanih bubrega s LC3B (a–e), uz nuklearno bojanje s DAPI-em. Strelice prikazuju obrasce ekspresije LC3B u glomerulima (g), zavijenim tubulima (ct), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (dct) i displastičnim tubulima (dt), označenima na DAPI slikama. Prikazana je imunoreaktivnost LC3B, DAPI bojanje i preklopljene slike kod kontrolne skupine (CTRL) u 30. gestacijskom tjednu (a), potkovastog bubrega (HK) u 27. tjednu (b), displastičnog bubrega (DYS) u 35. tjednu (c), dvostrukog uretera (DU) u 30. tjednu (d) i hipoplastičnog bubrega (HYP) u 37. tjednu (e). Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi 100 μm i odnosi se na sve slike. Grafikon (f) prikazuje postotak LC3B-pozitivnog područja u kori fetalnih bubrega (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), izražen kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte). Analiza je provedena pomoću jednofaktorske ANOVA s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s **** $P < 0.0001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset uzoraka. Grafikon (g) prikazuje dinamiku ekspresije LC3B kroz različite gestacijske periode (18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. tjedan) u kori fetalnih bubrega za sve analizirane skupine (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), modeliranu linearnom i nelinearnom regresijskom analizom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost.

4.2.2. Izražaj GRP78 u fetalnim humanim bubrezima

Imunohistokemijsko bojanje GRP78 u skupini zdravih uzoraka pokazalo je pozitivnu imunoreaktivnost u većini zavijenih tubula. Stanice PCT imale su intenzivno, punktiiformno bojanje, izraženo na apikalnim i bazolateralnim membranama, dok su DCT pokazivali izolirano, difuzno bojanje apikalnih membrana. Također, u visceralnim i parijetalnim stanicama Bowmanove kapsule zabilježeno je punktiiformno bojanje (Slika 21a). Kod obje skupine – i u kontrolnim uzorcima i u CAKUT fenotipovima – endotelne stanice arterija bile su pozitivne na GRP78. U bubrezima zahvaćenim CAKUT-om, signal GRP78 bio je slabiji i uglavnom difuzan, osobito na apikalnim membranama zavijenih tubula. U glomerulima su pojedine visceralne stanice pokazivale umjereni punktiiformni signal, dok je u JGA, osobito kod DYS i DU, zabilježeno izraženo difuzno bojanje (Slika 21b–e). Usporedbom kontrolne skupine i CAKUT fenotipova, postotak GRP78-pozitivnih stanica bio je značajno viši u kontrolnim uzorcima ($P < 0,0001$). Kao što je prikazano na Slici 21f, ekspresija GRP78 bila je značajno niža u HYP u usporedbi s DYS ($P < 0,0001$) i DU ($P = 0,002$).

U svim analiziranim fenotipovima, ekspresija GRP78 smanjivala se tijekom fetalnog razvoja, a uočen je kvadratni trend pada ekspresije. Najviši izražaj GRP78 zabilježen je u

sljedećim tjednima gestacije: kontrolna skupina ($R^2 = 40\%$) u 27. tjednu, HK ($R^2 = 96\%$) i DU ($R^2 = 100\%$) u 22. tjednu, DYS ($R^2 = 96\%$) u 27. tjednu te HYP ($R^2 = 30\%$) također u 22. tjednu gestacije (Slika 21g).



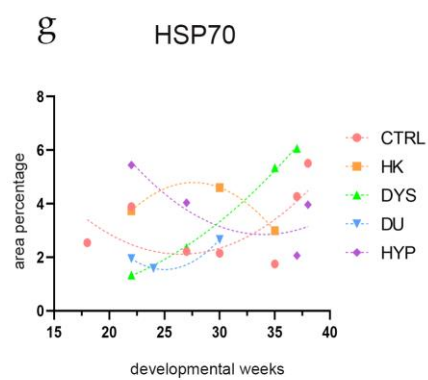
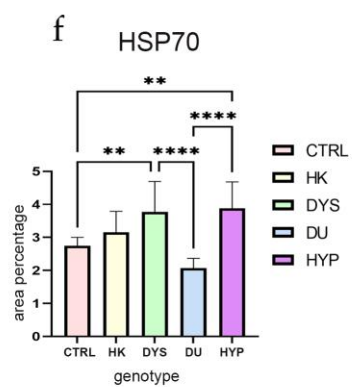
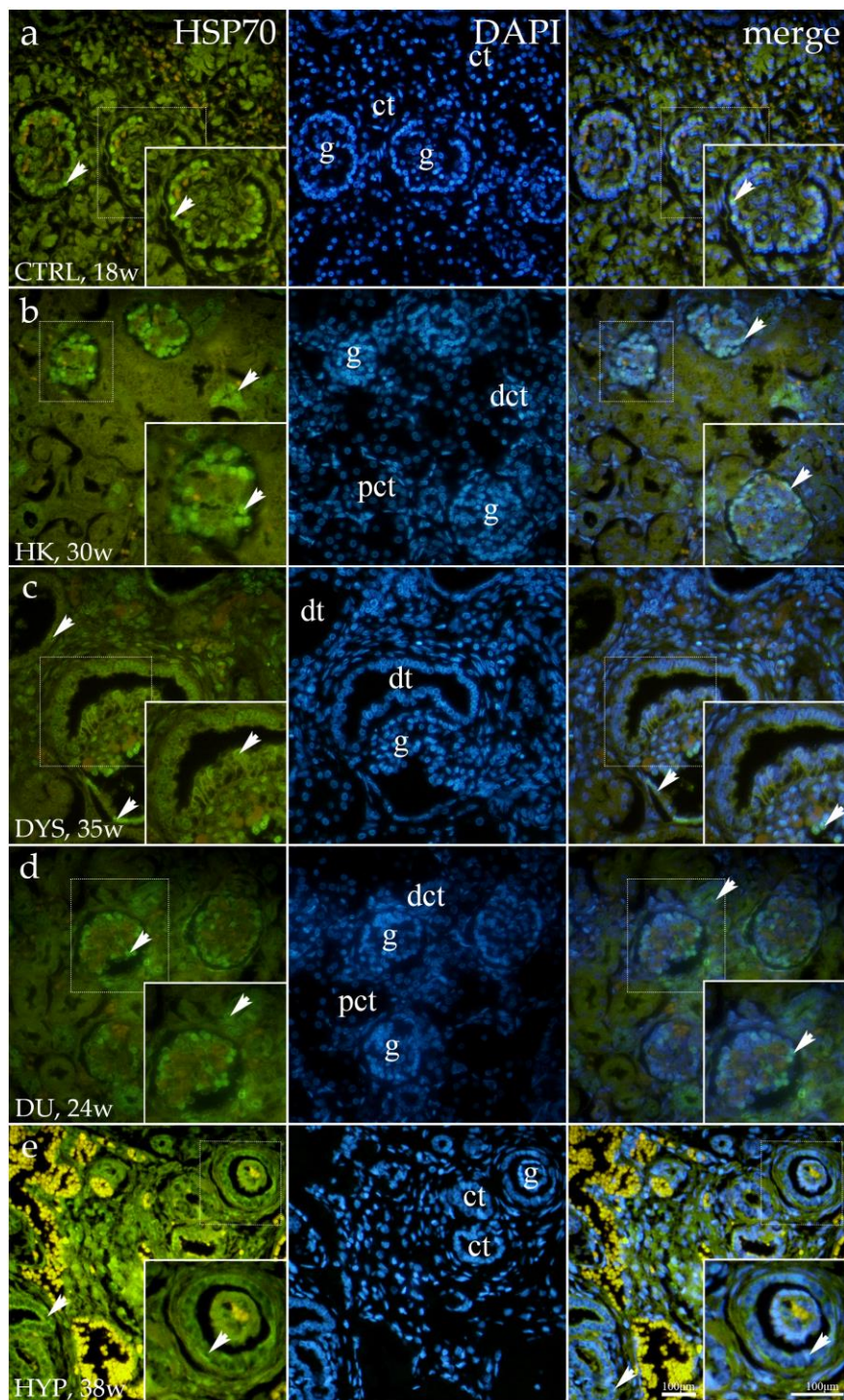
Slika 21. Imunofluorescencijsko bojanje fetalnih humanih bubrega s GRP78 (a–e), uz nuklearno bojanje s DAPI-em. Strelice prikazuju obrasce ekspresije GRP78 u glomerulima (g), zavijenim tubulima (ct), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (det) i displastičnim tubulima (dt), označenima na DAPI slikama. Prikazana je imunoreaktivnost GRP78, DAPI bojanje i preklopljene slike kod kontrolne skupine (CTRL) u 22. gestacijskom tjednu (a), potkovastog bubrega (HK) u 30. tjednu (b), displastičnog bubrega (DYS) u 35. tjednu (c), dvostrukog uretera (DU) u 24. tjednu (d) i hipoplastičnog bubrega (HYP) u 38. tjednu (e). Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi $100\ \mu\text{m}$ i odnosi se na sve slike. Grafikon (f) prikazuje postotak GRP78-pozitivnog područja u kori fetalnih bubrega (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), izražen kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte). Analiza je provedena pomoću jednofaktorske ANOVA s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s *** $P < 0.001$, ***** $P < 0.0001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset uzoraka. Grafikon (g) prikazuje dinamiku ekspresije GRP78 kroz različite gestacijske periode (18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. tjedan) u kori fetalnih bubrega za sve analizirane skupine (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), modeliranu linearnom i nelinearnom regresijskom analizom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost.

4.2.3. Izražaj HSP70 u fetalnim humanim bubrezima

U kontrolnoj skupini, imunoreaktivnost HSP70 bila je zabilježena sporadično u visceralnom sloju glomerularne kapsule, kako u jukstamedularnoj, tako i u nefrogenoj zoni (Slika 22a). Uzorci bubrega s fenotipovima DU i HK imali su sličan obrazac bojanja (Slika 22b,d), ali je signal bio znatno intenzivniji i zahvaćao je gotovo sve visceralne stanice Bowmanove kapsule. U tim fenotipovima zavijeni tubuli nisu imali nikakvu ekspresiju HSP70. Obrazac bojanja glomerula u bubrezima s hipoplastičnim fenotipom bio je vrlo sličan, no uz to su apikalne i bazolateralne membrane zavijenih tubula pokazivale slabu i sporadičnu ekspresiju HSP70. S druge strane, DYS pokazivali su potpuno drugačiji ekspresijski obrazac. Visceralne stanice i parijetalne stanice Bowmanove kapsule zadržale su jak, difuzan signal. U jezgrama epitelnih stanica displastičnih tubula također je zabilježena difuzna ekspresija HSP70.

Analiza postotka područja pozitivnog na HSP70 pokazala je da HYP ima značajno veći udio HSP70-pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P = 0,0026$) i DU fenotipom ($P < 0,0001$). Nadalje, i DYS je imao značajno veći udio HSP70-pozitivnih stanica u odnosu na CTRL ($P = 0,0077$) i DU ($P < 0,0001$) (Slika 22f). Što se tiče dinamike ekspresije

tijekom fetalnog razvoja, fenotipovi HK i HYP imali su eksponencijalni pad ekspresije s gestacijskom dobi ($R^2 = 100\%$ i $R^2 = 71\%$), s najvišom ekspresijom u 27. i 22. gestacijskom tjednu. Nasuprot tome, CTRL, DYS i DU fenotipovi pokazivali su pozitivan kvadratni trend ekspresije ($R^2 = 43\%$, $R^2 = 99\%$ i $R^2 = 100\%$) (Slika 22g).



Slika 22. Imunofluorescencijsko bojanje fetalnih humanih bubrega s HSP70 (a–e), uz nuklearno bojanje s DAPI-em. Strelice prikazuju obrasce ekspresije HSP70 u glomerulima (g), zavijenim tubulima (ct), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (det) i displastičnim tubulima (dt), označenima na DAPI slikama. Prikazana je imunoreaktivnost HSP70, DAPI bojanje i preklapljene slike kod kontrolne skupine (CTRL) u 18. gestacijskom tjednu (a), potkovastog bubrega (HK) u 30. tjednu (b), displastičnog bubrega (DYS) u 35. tjednu (c), dvostrukog uretera (DU) u 24. tjednu (d) i hipoplastičnog bubrega (HYP) u 38. tjednu (e). Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi $100\ \mu\text{m}$ i odnosi se na sve slike. Grafikon (f) prikazuje postotak HSP70-pozitivnog područja u kori fetalnih bubrega (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), izražen kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte). Analiza je provedena pomoću jednofaktorske ANOVA s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s ** $P < 0.01$, ***** $P < 0.0001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset uzoraka. Grafikon (g) prikazuje dinamiku ekspresije HSP70 kroz različite gestacijske periode (18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. tjedan) u kori fetalnih bubrega za sve analizirane skupine (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), modeliranu linearnom i nelinearnom regresijskom analizom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost.

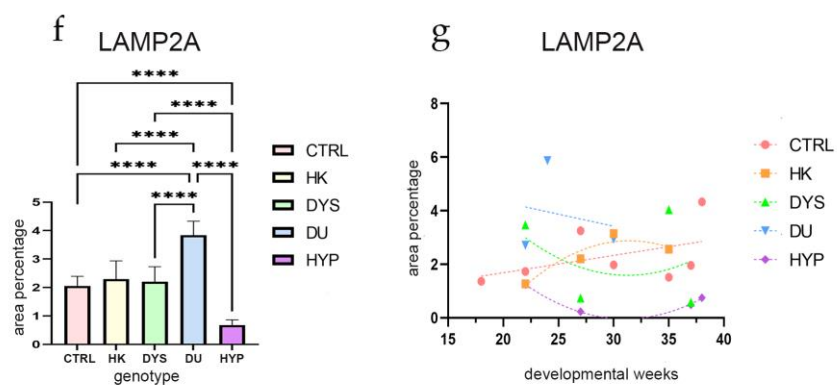
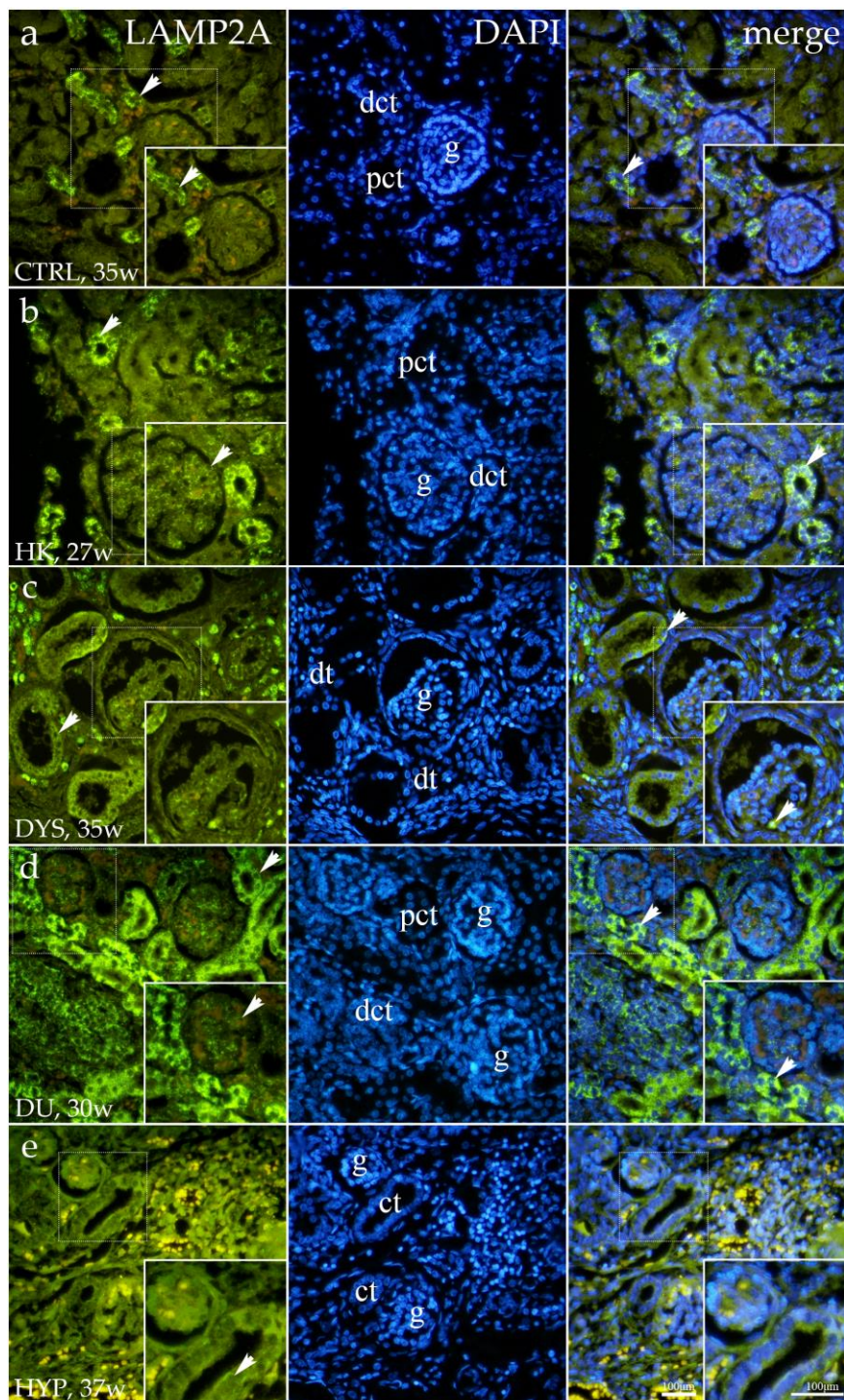
4.2.4. Izražaj LAMP2A u fetalnim humanim bubrežima

U kontrolnoj skupini, imunohistokemijsko bojanje s LAMP2A protutijelima pokazalo je intenzivan, difuzan obrazac ekspresije u zavijenim tubulima jukstamedularne regije, uz umjereni, punktiformni citoplazmatski signal u visceralnim stanicama glomerula. U nefrogenoj zoni, PCT i DCT u gotovo jednoj trećini analiziranih tubula pokazivali su difuzno bazolateralno membransko i citoplazmatsko bojanje, dok je u jukstamedularnoj regiji taj obrazac bio sporadičan (Slika 23a). HK imao je sličan obrazac bojanja kao kontrolna skupina, s punktiformnim bazolateralnim signalom u većini tubula te difuznim signalom u samo manjem dijelu zavijenih tubula smještenih u jukstamedularnoj regiji. Međutim, ukupan intenzitet ekspresije bio je smanjen (Slika 23b). U displastičnim bubrežima bojanje LAMP2A bilo je podjednako intenzivno u nefrogenoj i jukstamedularnoj regiji, pri čemu su displastični tubuli pokazivali jak, pretežno punktiforman, povremeno i difuzan signal, bazolateralno i apikalno. U istim uzorcima glomerularno je opaženo slabo punktiformno bojanje u JGA te slabo citoplazmatsko bojanje visceralnih stanica (Slika 23c). DU uzorci imali su difuzno membransko i citoplazmatsko bojanje u više od 80% zavijenih tubula, uz slabi punktiformni signal u

visceralnim stanicama glomerula (Slika 23d). Modeli hipoplastičnog bubrega pokazivali su sporadičnu i slabu ekspresiju LAMP2A na apikalnim membranama PCT (Slika 23e).

Postotak LAMP2A-pozitivnih stanica bio je značajno viši u CTRL u usporedbi s HYP ($P < 0,0001$), dok je DU pokazao značajno viši postotak u odnosu na sve ostale fenotipove ($P < 0,0001$; Slika 23f).

Tijekom fetalnog razvoja, postotak LAMP2A-pozitivnih stanica u DU bubrezima postupno se smanjivao ($R^2 = 95,5\%$, $\beta = -0,18 \pm 0,09$), dok je u kontrolnoj skupini zabilježen pozitivan linearni trend ($R^2 = 79,9\%$, $\beta = 0,13 \pm 0,064$). U HK fenotipu postotak pozitivnih stanica konstantno je rastao s vremenom, slijedeći kvadratni obrazac s vršnom ekspresijom u 30. gestacijskom tjednu ($R^2 = 89\%$). S druge strane, DYS i HYP pokazali su negativne kvadratne trendove ($R^2 = 90\%$; $R^2 = 99\%$; Slika 23g).



Slika 23. Imunofluorescencijsko bojanje fetalnih humanih bubrega s LAMP2A (a–e), uz nuklearno bojanje s DAPI-em. Strelice prikazuju obrasce ekspresije LAMP2A u glomerulima (g), zavijenim tubulima (ct), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (dct) i displastičnim tubulima (dt), označenima na DAPI slikama. Prikazana je imunoreaktivnost LAMP2A, DAPI bojanje i preklopljene slike kod kontrolne skupine (CTRL) u 35. gestacijskom tjednu (a), potkovastog bubrega (HK) u 27. tjednu (b), displastičnog bubrega (DYS) u 35. tjednu (c), dvostrukog uretera (DU) u 30. tjednu (d) i hipoplastičnog bubrega (HYP) u 37. tjednu (e). Najizraženija područja ekspresije prikazana su u umetnutim prikazima (*insertima*), koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$. Skalna crta iznosi $100\ \mu\text{m}$ i odnosi se na sve slike. Grafikon (f) prikazuje postotak LAMP2A-pozitivnog područja u kori fetalnih bubrega (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), izražen kao srednja vrijednost $\pm$ SD (vertikalne crte). Analiza je provedena pomoću jednofaktorske ANOVA s Tukeyjevim post hoc testom višestruke usporedbe. Statistički značajne razlike označene su s ***** $P < 0.0001$. Za svaki vremenski period analizirano je deset uzoraka. Grafikon (g) prikazuje dinamiku ekspresije LAMP2A kroz različite gestacijske periode (18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. tjedan) u kori fetalnih bubrega za sve analizirane skupine (CTRL, HK, DYS, DU, HYP), modeliranu linearnom i nelinearnom regresijskom analizom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost.

5. RASPRAVA

5.1. Izražaj LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A, A11 i AIF u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Razvoj bubrega, zajedno sa sazrijevanjem nefrona, jedan je od najpreciznije organiziranih i integriranih bioloških procesa, koji se odvija kroz koordinaciju brojnih gena i staničnih mehanizama. Poremećaj ovog višestupanjskog i izrazito kompleksnog procesa može dovesti do grešaka u nefrogenezi i rezultirati različitim strukturnim defektima bubrega i urotrakta, poznatih pod zajedničkim nazivom CAKUT. Ove malformacije predstavljaju najčešće prirođene anomalije i vodeći su uzrok završnog stadija bubrežne bolesti u djece (119, 120). U našim prethodnim istraživanjima na *yotari* miševima otkrili smo niz različitih markera te pokazali kako poremećaj u jednoj komponenti signalnog puta može dovesti do CAKUT fenotipa (121-123). Zahvaljujući mišjim eksperimentalnim modelima dosad smo najviše saznali o nasljednim čimbenicima koji sudjeluju u razvoju CAKUT-a, a svakim novim otkrivenim genom dolazimo sve bliže razumijevanju njegove etiologije (69). Kako je naše ranije istraživanje pokazalo snažnu ekspresiju DAB1 tijekom fetalnog razvoja bubrega te smanjenje ekspresije u postnatalnim zdravim bubrezima (100), pretpostavili smo da će knockout *Dab1* miševi imati drugačiji obrazac aktivacije autofagije i apoptoze, dvaju ključnih mehanizama za pravilno sazrijevanje i održavanje normalne funkcije bubrega (124, 125). U ovom istraživanju koristili smo *Dab1*^{-/-} mišji model kako bismo analizirali obrasce ekspresije LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A, A11 i AIF tijekom embrionalnog i postnatalnog razdoblja. Ovo istraživanje nije pokazalo značajnu ekspresiju LC3B u ranoj embrionalnoj fazi (E13.5). Signal imunoekspresije bio je blag kod oba genotipa, što upućuje na to da autolizosomi još nisu bili formirani, odnosno da autofagija još nije otpočela. No, u kasnijim embrijima (E15.5) opaženo je značajno povećanje LC3B-pozitivnih stanica u svim promatranim strukturama, osim u metanefrogenom mezenhimu. Sličan obrazac imunoreaktivnosti nastavljen je i u postnatalnom razdoblju, kada su *yotari* miševi imali značajno veći udio LC3B-pozitivnih stanica u svim analiziranim strukturama u usporedbi s kontrolom. U našem nedavnom istraživanju također je potvrđena pojačana ekspresija LC3B u glomerulima P11 i P14 *yotari* miševa, što vjerojatno odražava intenzivniju aktivnost autofagije u podocitima, potencijalno povezanu s gubitkom nožica podocita (engl. *foot process effacement*) i razvojem nefrotskog sindroma (123).

S druge strane, poznato je da inhibicija autofagije može aktivirati proapoptotske puteve povezane sa stresom endoplazmatskog retikuluma, što rezultira programiranom smrću podocita, a time i potencijalno štetnim posljedicama po bubreg (126, 127). Više studija

potvrđuje da autofagija u većini bubrežnih bolesti ima zaštitnu ulogu, osobito u prevenciji podocitopatija poput bolesti minimalnih promjena (engl. *minimal change disease* - MCD), koja može napredovati do kroničnog bubrežnog zatajenja (128). Nadalje, smanjena autofagijska aktivnost, primjerice u stanjima hiperglikemije, može doprinijeti dijabetičkoj nefropatiji i razvoju fibroze u epitelu bubrega, uključujući podocyte, proksimalne tubule, mezangijske i endotelne stanice (129). Poznato je da cisplatin, nefrotoksični kemoterapeutik, uzrokuje povećanu ekspresiju LC3B u proksimalnim tubulima. U tom kontekstu, inhibicija autofagije (npr. klorokinom) dodatno pogoršava bubrežnu disfunkciju i akutno oštećenje bubrega izazvano cisplatinom (130). Sve ovo ukazuje da autofagija najčešće djeluje citoprotektivno, a njezin signalni put potencijalna je terapijska meta. Ipak, u određenim stanjima autofagija može imati i štetan učinak, zbog čega su potrebna dodatna istraživanja da bi se ova hipoteza potvrdila.

Oba genotipa pokazivala su visok udio GRP78-pozitivnih stanica u embrionalnim fazama, s izraženijim signalom u zavijenim tubulima i metanefričkom mezenhimu kod *yotari* miševa. U E15.5 *yotari* je imao pojačanu citoplazmatsku ekspresiju u visceralnim stanicama glomerula u razvoju. Tijekom postnatalnog razdoblja, *yotari* je imao značajno veći udio pozitivnih stanica u PCT i DCT u svim promatranim periodima. Ovakav obrazac upućuje na ključnu ulogu GRP78 u ranom sazrijevanju ampula i sabirnih kanala, ali i na prisutan ER stres u svim promatranim postnatalnim strukturama *yotari* bubrega. GRP78, jedan od šaperona i senzor stresa ER, sprječava programiranu staničnu smrt promoviranjem pravilnog presavijanja proteina i eliminacijom pogrešno presavijenih molekula. Međutim, neka istraživanja pokazuju da GRP78 također može imati suprotan učinak, potičući fibrozu tubula bubrega putem IRE1/XBP1 signalnog puta (131-133). Ranija istraživanja s *Grp78* knockout miševima potvrdila su da je ovaj protein nužan za preživljavanje embrija, a njegov izostanak aktivira proapoptotske mehanizme koji dovode do embrionalne smrti (134, 135). Iako za sada nema studija koje direktno uspoređuju ekspresiju DAB1 i GRP78 u bubrezima, istraživanje Mimura i sur. pokazalo je da knock-in *Grp78* miševi imaju višu ekspresiju nefosforiliranog DAB1 u mozgu, uz smanjenu ekspresiju Reelin-a, što upućuje na to da GRP78 može regulirati Reelin/Dab1 signalni put (136). U uvjetima ER stresa, brojni proteini se disociraju od GRP78 i aktiviraju nizvodne puteve koji razgrađuju nepravilno presavijene proteine.

Bojanje GRP78 u postnatalnim *yotari* bubrezima može stoga ukazivati na stres ER, što je već opisano u brojnim akutnim i kroničnim bubrežnim patologijama (112, 137, 138). Naši podaci sugeriraju da funkcionalno utišavanje gena *Dab1* dovodi do nakupljanja pogrešno presavijenih proteina u lumenu ER-a, što zatim potiče GRP78 signalni put i, u slučaju

preopterećenja kapaciteta autofagije, čini apoptozu mogućim glavnim mehanizmom bubrežne disfunkcije u *yotari* miševima.

U embrionalnim fazama, značajna razlika u postotku HSC70-pozitivnih stanica zabilježena je u E15.5, s povećanjem broja pozitivnih stanica zavijenih tubula kod *yotari* miševa. Isti trend opažen je i postnatalno, gdje su *yotari* jedinke pokazivale povišen intenzitet signala u svim vremenskim točkama osim P4. CMA je selektivni proces razgradnje proteina kojim precizno upravlja HSC70. Istraživanje Cuervo i sur. pokazalo je da izloženost toksinu 2,2,4-trimetilpentanu povećava razinu β 2-mikroglobulina (CMA supstrata) u bubrezima i jetri, što dovodi do preopterećenja lizosoma i teškog oštećenja stanica (139). Tijekom akutnog dijabetesa melitusa, CMA je bila značajno inhibirana u korteksu bubrega štakora, uz nakupljanje proteina s KFERQ-sličnim motivom (140). Iako ne postoje izravne studije koje povezuju Reelin/Dab1 signalni put s CMA posrednicima poput HSC70, naši rezultati upućuju na to da veći postotak HSC70-pozitivnih stanica kod *yotari* miševa korelira s pojačanom CMA aktivnošću i ima zaštitnu ulogu u kortikalnim tubulima.

Tijekom gestacije, imunoreaktivnost LAMP2A bila je prisutna u nezrelim glomerulima, pri čemu je *yotari* pokazivao značajno veći postotak LAMP2A-pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ekspresijski obrazac LAMP2A u zavijenim tubulima podsjećao je na onaj HSC70, osobito u kasnijim fazama embrionalnog razvoja (E15.5). Dok je u PCT zabilježena značajna razlika u svim postnatalnim periodima, DCT *yotari* miševa imao je viši postotak pozitivnih stanica samo u P4. Budući da LAMP2A djeluje kao receptor za šaperone koji prenose nepravilno presavijene proteine, ovakav obrazac ekspresije bio je i očekivan. Jedina studija koja opisuje lokalizaciju LAMP2A u mutiranim bubrezima, ona Zhang i sur., otkrila je apikalnu distribuciju LAMP2A u PCT bubrega kod modela cistinoze, dok je bazalna ekspresija izostajala (108, 141). Ovi nalazi sugeriraju da izostanak *Dab1* dovodi do nakupljanja CMA supstrata u proksimalnim tubulima, što uzrokuje i povećanu ekspresiju LAMP2A. Istraživanja na LAMP2A knockout miševima pokazala su da stanice bez ovog receptora postaju osjetljivije na stres, dok su raniji radovi potvrdili njegovu ključnu ulogu u regulaciji CMA, osobito tijekom oksidativnog stresa (142, 143).

Ekspresija A11 tijekom ranog embrionalnog razvoja (E13.5) bila je minimalna kod oba genotipa, uz iznimku slabog punktiformnog signala na apikalnim membranama tubula. Značajna razlika u bojanju metanefrogenog mezenhima kod *yotari* miševa u odnosu na kontrole može ukazivati na raniju aktivaciju ovog markera kod mutiranih jedinki u procesima

morfogeneze, vjerojatno povezanim s promjenama u citoskeletnoj reorganizaciji ili ranim znakovima staničnog stresa. U postnatalnom razdoblju, prisutnost A11 signala u PCT i DCT kod *yotari* miševa, osobito izražena u starijem razvojnem stadiju (P14) upućuje na potencijalnu ulogu A11 u maturaciji tubulskih stanica, što je u skladu s nalazima da neki adaptorski proteini i membranski receptori povezani s citoskeletom sudjeluju u polarizaciji i transportu molekula tijekom diferencijacije (144, 145). Nedostatak A11 signala u glomerulima svih ispitivanih skupina može upućivati na specifičnu regionalnu ekspresiju ovog proteina. S obzirom na dosad ograničena istraživanja vezana uz A11 ekspresiju u bubregu, potrebne su dodatne studije kako bi se potvrdila njegova funkcionalna uloga u nefrogenezi i postnatalnom održavanju funkcije (146).

Tijekom embrionalnog razvoja, *yotari* miševi pokazivali su povišenu ekspresiju AIF-a u bubrežnim tjelešcima, s perinuklearnom lokalizacijom signala već u najranijoj promatranoj fazi (E13.5), što bi moglo upućivati na ranu aktivaciju kaspaza-neovisne apoptotske signalizacije, što podupire tezu o genotipski uvjetovanoj disregulaciji apoptoze (147). U postnatalnom razdoblju, mlađe *yotari* jedinke (P4 i P11) imale su povećanu ekspresiju AIF-a u svim analiziranim bubrežnim strukturama, što bi moglo ukazivati na perzistentan stanični stres ili poremećaje u mehanizmima preživljenja stanica. U glomerulima je signal bio slab i punktiiforman, najčešće citoplazmatski lokaliziran, dok je u PCT-u bio difuzan s bazolateralnom preraspodjelom, a u DCT-u punktiiforman i perinuklearn. Ovakva lokalizacijska specifičnost AIF-a podupire njegove uloge u različitim aspektima stanične regulacije, od energetskog odgovora mitohondrija do nuklearne fragmentacije DNA, što je ranije opisano u modelima kaspaza-neovisne apoptoze (148, 149). Povećani izražaj AIF-a kod *yotari* jedinki u oba razvojna razdoblja sugerira moguć poremećaj homeostatske ravnoteže između autofagije i apoptoze, čime bi AIF mogao predstavljati ključnu poveznicu između mitohondrijskog oštećenja i stanične smrti u ovom modelu (150).

Dinamički i ekspresijski obrasci LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A, A11 i AIF u kontrolnim i *yotari* životinjama jasno ukazuju na njihovu važnost tijekom razvoja bubrega, ali i u očuvanju njegove funkcije u postnatalnom periodu. Možemo pretpostaviti da utišavanje *Dab1* gena uzrokuje nakupljanje nepravilno presavijenih proteina, što aktivira šaperone i druge markere autofagije. Na aktivnost CMA utječu brojni čimbenici, uključujući gladovanje, hormon rasta, oksidativni stres, lipidi, starenje itd. Iako mehanizam koji inicira autofagijski odgovor u *Dab1*^{-/-} miševima još uvijek nije poznat, na temelju povećane ekspresije GRP78 možemo

pretpostaviti da oksidativni stres ima ključnu ulogu, osobito u zavijenim tubulima fetalnih i postnatalnih bubrega.

5.2. Izražaj LC3B, GRP78, HSC70, LAMP2A u fetalnim humanim bubrezima

Otpribliže 40% svih slučajeva kronične bubrežne bolesti u djece diljem svijeta uzrokovano je CAKUT-om (57). Ove se anomalije mogu javljati izolirano ili kao dio sindroma s nekim ekstrarenalnim manifestacijama (151, 152). Više od 20 monogenских poremećaja do sada je povezano s razvojem CAKUT-a (153). Klinički fenotip može biti posljedica poremećaja složene molekularne regulacije u različitim fazama razvoja bubrega, kojom upravljaju brojni geni (154, 155). Ovo istraživanje analiziralo je prostorno-vremensku imunoekspresiju proteina povezanih s autofagijom (LC3B, LAMP2A, GRP78 i HSP70) u zdravim, fetalnim ljudskim bubrezima te u bubrezima s prirođenim anomalijama.

Nedavna istraživanja pokazala su da je autofagija ključna za razvoj bubrega, a njena disfunkcija je opisana kao glavni patogenetski mehanizam u različitim modelima bubrežnih bolesti (156, 157). U našem prethodnom istraživanju na *yotari* miševima potvrdili smo važnost autofagije u razvoju bubrega i pretpostavili da ovaj mehanizam ima glavnu ulogu u sprječavanju programirane stanične smrti (158). U kontrolnoj skupini, visceralne stanice glomerula pokazale su blago LC3B bojanje, dok su zavijeni tubuli imali malobrojne pozitivne stanice na apikalnim membranama nefrogene i jukstamedularne zone. Sličan obrazac zabilježen je i kod DU, HYP i HK fenotipova. Budući da podociti u terminalno diferenciranom stadiju iskazuju visoku bazalnu aktivnost autofagije, uz prisutnost dvostrukih membranskih autofagosoma u citoplazmi, pozitivan LC3B signal u visceralnim stanicama Bowmanove kapsule bio je očekivan (125, 159, 160). Prema dosadašnjim saznanjima, nakon konjugacije s fosfatidiletanolaminom (PE), LC3B se selektivno lokalizira na membranu fagofora, što predstavlja ključni korak u formiranju autofagosoma (161). Međutim, displastični bubrezi pokazivali su značajno veći udio LC3B-pozitivnih stanica u usporedbi sa svim ostalim fenotipovima. Ti su uzorci imali izraženo perinuklearno bojanje u DCT te sporadični signal u parijetalnim stanicama Bowmanove kapsule i visceralnim stanicama glomerula. Također, displastični bubrezi pokazali su progresivno povećanje LC3B izražaja s gestacijskom dobi, dok su CTRL, HK, DU i HYP imali silazni trend. Ovi obrasci vjerojatno ukazuju na važnu ulogu LC3B u prevenciji programirane stanične smrti, što je prethodno pokazano i kod *Lc3b* knockout miševa (162). Progresivno povećanje oksidativnog stresa moglo bi biti uzrok pozitivnog kvadratnog trenda LC3B u DYS bubrezima, kao što je prikazano u modelima akutnog bubrežnog oštećenja (AKI) izazvanog cisplatinom, gdje je kod životinja s oštećenom

autofagijom došlo do značajnog mitohondrijskog oštećenja, produkcije ROS, oštećenja DNA i aktivacije p53 (163). Na ovaj način autofagija štiti bubrege od AKI smanjenjem oštećenja DNA i uklanjanjem mitohondrija koji proizvode ROS. Ranija istraživanja su pokazala da puromicin aminonukleoizid uzrokuje smanjenje LC3 ekspresije u podocitima tijekom akutne nefroze, a porast tijekom faze oporavka (159). Uz to, ista tvar inducira stres endoplazmatskog retikuluma u glomerulima, što upućuje na povezanost ER stresa i autofagije (164). Zaštitna uloga autofagije u displastičnim bubrezima najvjerojatnije je razlog navedenih rezultata našeg istraživanja, s obzirom na to da su takvi bubrezi već ranije opisani kao abortivne tubulske i glomerularne strukture okružene s nakupinama mezoderma s lobarnom dezorganizacijom i visokim razinama oksidativnog stresa (165, 166).

GRP78, šaperon iz HSP70 obitelji, induciran stresom, sudjeluje u brojnim staničnim funkcijama, uključujući presavijanje i sastavljanje novo sintetiziranih proteina, usmjeravanje nepravilno presavijenih proteina prema proteasomskoj razgradnji, regulaciju homeostaze kalcija i stresa ER (167, 168). GRP78 vjerojatno ima ključnu ulogu u ranom embrionalnom razvoju, kada je stanična proliferacija i sinteza proteina visoka. U istraživanju na knockout miševima, Luo i sur. pokazali su da izostanak GRP78 aktivira proapoptotske mehanizme, uzrokuje smanjenu proliferaciju stanica, što u konačnici vodi do embrionalne smrtnosti (134). U ovom istraživanju, PCT i DCT kontrolne skupine pokazivali su najvišu imunoreaktivnost na GRP78, što potvrđuje njegovu važnu ulogu u razvoju zdravog bubrega. U svim CAKUT fenotipovima, apikalne membrane zavijenih tubula imale su slabiji, uglavnom difuzan signal, s tim da je najniža ekspresija zabilježena u HYP bubrezima. Ovi rezultati sugeriraju zaštitnu ulogu GRP78 u ranoj nefrogenezi, jer njegov izostanak može dovesti do nakupljanja nepravilno presavijenih proteina, što djeluje kao okidač za aktivaciju apoptoze (134). Poznato je da određene genske mutacije povećavaju apoptozu mokraćovodnih pupoljaka i smanjuju njihovo grananje, što rezultira malim brojem nefrona i bubrežnom hipoplazijom kod ljudi (169-171). To objašnjava i nižu GRP78 ekspresiju u HYP bubrezima u našem istraživanju. Endotelne stanice u bubrezima, s i bez CAKUT-a, pokazale su izraženu GRP78 imunoreaktivnost. Iako ovakav nalaz nije dosad usporedno istražen, Jin i sur. pokazali su prisustvo GRP78 u staničnim komponentama krvnih žila, uključujući adventicijske fibroblaste, glatke mišićne stanice i endotel (172). Analiza izražaja GRP78 kroz gestacijske tjedne pokazala je postupan pad u svim fenotipovima, što je u skladu s ranijim podacima koji potvrđuju ključno djelovanje GRP78 u ranoj embriogenezi (134, 173). Sve ovo upućuje na zaključak da GRP78 ima zaštitnu ulogu u

ranoj fazi razvoja bubrega, a njegov izostanak može doprinijeti razvoju CAKUT-u, osobito HYP fenotipa.

U našem istraživanju, najintenzivniji LAMP2A signal zabilježen je u zavijenim tubulima DU bubrega, dok su visceralne stanice glomerula imale blag, punktiforman signal. HYP bubrezi imali su najslabiju ekspresiju LAMP2A, ograničenu na apikalne membrane PCT-a. Ovakvi rezultati potvrđuju one iz prethodnog istraživanja na *yotari* miševima, gdje su mutirane jedinke imale izraženiju imunoreaktivnost (158). Budući da LAMP2A djeluje kao lizosomalni receptor za CMA, varijacije u njegovoj sintezi, degradaciji i subkompartimentalizaciji utječu na općenitu CMA aktivnost (174). U knockout modelima, stanice s reduciranom CMA aktivnošću bile su povećano osjetljive na stanični stres, a potpuna blokada dovela je do stanične smrti (143, 175). Osim toga, inaktivacija LAMP2A dovodi do smanjene ekspresije glikolitičkih enzima GAPDH i PGK, smanjenja glikolize i ukupne količine ATP-a, što rezultira smanjenom proliferacijom i povećanom apoptotičkom aktivnošću (176). Autofagija je poznata kao ključni mehanizam u svim fazama embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja, jer omogućuje preživljavanje, eliminaciju organela i proteinskih agregata, te podržava homeostazu pod nutritivnim stresom (177). U našem istraživanju, LAMP2A je jedino imao pozitivan linearni trend kroz gestacijske tjedne u kontrolnoj skupini, što potvrđuje njegovu važnu ulogu tijekom cijelog ranog razvoja bubrega. Prijašnja istraživanja su pokazala da se ekspresija LAMP2A smanjuje s dobi, dok njegova prekomjerna ekspresija u fetalnom razdoblju štiti od gubitka CMA aktivnosti u starosti, poboljšava funkciju organa i smanjuje nakupljanje oštećenih proteina (178). Aberantna lokalizacija i ekspresija LAMP2A u CAKUT bubrezima vjerojatno potiče nakupljanje oksidiranih proteina, a daljnja istraživanja su potrebna za razjašnjenje uloge CMA u patogenezi CAKUT-a.

HSP70, evolucijski očuvan i najpoznatiji šaperon, sudjeluje u presavijanju proteina nakon denaturacije, vraćajući ih u pravilnu konformaciju. Prijašnja studija na djeci s jednostranom opstrukcijom ureteropelvičnog spoja (UPJO) pokazala je da ekspresija HSP70 korelira s duljinom opstrukcije, uz najintenzivniji signal u sabirnim kanalićima medule i korteksa te proksimalnim tubulima (179). Sličan obrazac bojanja uočen je u našem istraživanju, gdje su displastični i hipoplastični tubuli pokazivali izražen, difuzan signal HSP70. Budući da je normalan razvoj i homeostaza bubrega ovisna o regulaciji apoptoze, sve je više dokaza da je HSP70 ključan modulator apoptotskih i oksidativnih puteva (111). Murer i sur. su pokazali da VUR i displazija/hipoplazija mogu biti posljedica disregulacije genske mreže koja uključuje i apoptozu (180). U našem istraživanju, pojačana ekspresija HSP70 u DYS i HYP bubrezima

može se pripisati povećanom oksidativnom stresu (181). Pozitivan kvadratni trend HSP70 u CTRL i DYS fenotipovima tijekom gestacije ukazuje na važnu ulogu ovog šaperona u održavanju broja stanica i diferencijaciji, osobito tijekom mezodermno-epitelne tranzicije (182).

Analiza prostorno-vremenske ekspresije LC3B, GRP78, HSP70 i LAMP2A u normalnim i CAKUT bubrezima pruža važan uvid u molekularne mehanizme razvoja bubrega i patogeneze CAKUT-a. Navedeni s autofagijom povezani proteini imaju ključnu ulogu u razvoju i očuvanju funkcije bubrega. Premda oksidativni stres predstavlja jedan od najvažnijih čimbenika u disregulaciji ispitivanih puteva, potrebna su dodatna istraživanja molekularnih mehanizama CAKUT-a. Takvi uvidi mogli bi otvoriti nove mogućnosti za razvoj dijagnostičkih i terapijskih strategija u prirođenim i stečenim bubrežnim bolestima, čime bi se dugoročno poboljšala kvaliteta života oboljelih.

6. ZAKLJUČAK

1. Tijekom starijeg embrionalnog perioda (E15.5), *yotari* miševi su pokazivali povišenu ekspresiju LC3B u svim analiziranim strukturama osim u metanefrogenom mezenhimu, što ukazuje na ranu aktivaciju autofagijskog mehanizma i njegovu potencijalnu zaštitnu ulogu tijekom nefrogeneze.
2. U postnatalnim razvojnim fazama, *yotari* miševi su nastavili imati statistički značajno viši postotak LC3B-pozitivnih stanica u svim promatranim strukturama (glomerulima, PCT i DCT) u usporedbi s divljim tipom, što sugerira da povećana aktivnost autofagije može imati kompenzatornu ulogu u održavanju funkcije podocita i tubula u uvjetima genetski induciranog staničnog stresa.
3. GRP78 je imao intenzivnu ekspresiju kod *yotari* miševa tijekom embrionalnog razvoja u svim promatranim strukturama, a osobito u ampulama i sabirnim kanalićima, što ukazuje na povećanu razinu stresa ER i potrebu za aktivacijom zaštitnih šaperona tijekom organogeneze kod mutiranih jedinki.
4. U postnatalnom razdoblju, *yotari* miševi su zadržavali visoku ekspresiju GRP78 u PCT i DCT u usporedbi s kontrolnim jedinkama.
5. HSC70 je kod *yotari* miševa imao difuznu ekspresiju u zavijenim kanalićima tijekom embrionalnog razvoja.
6. U postnatalnom razdoblju HSC70 je zadržao intenzivan signal u DCT i PCT, što sugerira stanje pojačanog staničnog stresa kod mutiranih jedinki zbog potencijalnog nakupljanja nepravilnog presavijenih proteina.
7. LAMP2A, kao ključni receptor CMA puta, pokazao je značajno povišenu ekspresiju u bubrezima *yotari* miševa embrionalnog perioda, osobito u glomerulima u razvoju.
8. U postnatalnom periodu, izražaj LAMP2A bio je najintenzivniji u PCT mutiranih jedinki, što potvrđuje njegovu ulogu u fiziološkoj maturaciji bubrega i očuvanju proteinske homeostaze u epitelu zavijenih tubula.
9. U embrionalnom periodu *yotari* miševi su pokazivali difuznu ekspresiju A11 u metanefrogenom mezenhimu s izraženim bojanjem apikalnih membrana zavijenih kanalića.

10. U postnatalnom razdoblju, a osobito kod starijih jedinki (P14) postojao je intenzivan signal u apikalnoj membrani PCT, kao i difuzan signal apikalne i bazolateralne membrane DCT kod *yotari* miševa.
11. AIF, kao predstavnik kaspaza-neovisnog apoptotskog puta, bio je značajno povišen u bubrežnim tjelešcima i sabirnim kanalićima *yotari* miševa u oba embrionalna stadija.
12. U postnatalnom razdoblju, AIF je bio izražen u bazolateralnim membranama PCT i perinuklearno u DCT kod *yotari* miševa, što potvrđuje njegovu aktivaciju u uvjetima produljenog staničnog stresa i insuficijentne autofagijske kompenzacije.
13. Imunoekspresija LC3B u kontrolnim fetalnim bubrezima bila je blaga i neujednačena, s prisutnošću punktiiformnog signala u visceralnim stanicama glomerula i apikalnim membranama zavijenih tubula, što upućuje na fiziološku bazalnu aktivnost autofagije u fazama normalnog razvoja bubrega.
14. Najintenzivniji izražaj LC3B zabilježen je u displastičnim bubrezima, gdje su distalni zavijeni kanalići pokazivali difuznu perinuklearnu ekspresiju, dok su visceralne i parijetalne stanice Bowmanove kapsule također bile pozitivne, uz statistički značajno viši udio LC3B-pozitivnih stanica u odnosu na sve ostale fenotipove.
15. Kvadratni trend porasta intenziteta LC3B signala kroz gestacijske tjedne u DYS fenotipu, za razliku od negativnog trenda u CTRL, HK, DU i HYP bubrezima, ukazuje na potencijalnu kompenzatornu ulogu autofagije u uvjetima displastične morfologije i povećanog oksidativnog stresa.
16. GRP78 je u kontrolnim bubrezima pokazivao snažnu punktiiformnu ekspresiju u apikalnim i bazolateralnim membranama PCT i difuznu u DCT, s pozitivnim signalom u visceralnim i parijetalnim stanicama Bowmanove kapsule, što potvrđuje njegovu važnu funkciju tijekom normalnog fetalnog razvoja.
17. Svi CAKUT fenotipovi pokazali su slabiji izražaj GRP78 u zavijenim tubulima, s osobito niskim postotkom pozitivnih stanica u hipoplastičnim bubrezima što može upućivati na nedostatak šaperonske zaštite i pojačanu osjetljivost stanica na stres endoplazmatskog retikuluma.
18. HSP70 je u kontrolnoj skupini imao sporadičan signal u visceralnim stanicama glomerula, dok su DU i HK imali pozitivne kapsule gotovo svih prikazanih glomerula. DYS i

HYP bubrezi pokazivali su snažno, difuzno bojanje tubula, što ukazuje na pojačanu citoprotektivnu aktivaciju u uvjetima patološkog razvoja.

19. LAMP2A u kontrolnim bubrezima pokazivao je difuznu membransku i citoplazmatsku ekspresiju u zavijenim tubulima, uz punktiformnu citoplazmatsku signalizaciju u visceralnim stanicama glomerula. Najizraženija ekspresija LAMP2A zabilježena je u DU fenotipu, dok je HYP imao najslabiju imunoreaktivnost, ograničenu na apikalne membrane PCT-a.

20. Pozitivni linearni trend izražaja LAMP2A u kontrolnoj skupini kroz gestacijske tjedne sugerira njegovu kontinuiranu ulogu u održavanju stanične homeostaze tijekom nefrogeneze. Suprotno tomu, DU bubreg pokazivao je silazni linearni trend, dok su HYP i DYS pokazivali negativne kvadratne trendove, što može ukazivati na narušenu CMA aktivnost u ovim fenotipovima.

7. SAŽETAK

Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT) predstavljaju najčešći uzrok kronične bubrežne bolesti i završnog stadija bubrežnog zatajenja u djece. Iako su genetski čimbenici prepoznati kao ključni u etiopatogenezi ovih anomalija, molekularni mehanizmi koji stoje iza njih još nisu u potpunosti razjašnjeni. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati prostorno-vremensku ekspresiju proteina povezanih s autofagijom i apoptozom – u ljudskim fetalnim bubrezima s različitim CAKUT fenotipovima te u eksperimentalnom mišjem modelu (*yotari*) koji je karakteriziran mutacijom u *Dab1* genu.

U *yotari* modelu zabilježeni su statistički značajni poremećaji ekspresije svih promatranih proteina u odnosu na kontrolnu skupinu (wt), pri čemu su LC3B, GRP78 i LAMP2A pokazivali progresivno povećanje tijekom razvoja, dok je AIF bio dominantno lokaliziran u perinuklearnom području glomerula u razvoju. Ovi rezultati upućuju na to da deregulacija autofagijskih i apoptotskih putova može igrati ključnu ulogu u razvoju CAKUT-a, a posebno u kontekstu mutacija u *Dab1* genu.

U humanom dijelu istraživanja analizirani su zdravi fetalni bubrezi i bubrezi s fenotipovima dupliciranog uretera (DU), hipoplazije (HYP), displazije (DYS) i potkovastog bubrega (HK) pomoću imunohistokemijskih metoda i semikvantitativne evaluacije. Najizraženije razlike u ekspresiji autofagijskih markera zabilježene su u displastičnim bubrezima, gdje je LC3B pokazivao snažno perinuklearno bojanje u DCT, dok je GRP78 bio značajno smanjen u hipoplastičnim bubrezima. HSP70 i LAMP2A bili su izraženiji u DU i DYS fenotipovima, što može upućivati na kompenzatorni odgovor na stanični stres

8. LAIČKI SAŽETAK

Prirođene bolesti bubrega kod djece mogu dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema, uključujući potrebu za dijalizom ili transplantacijom. U ovom istraživanju analizirali smo razvoj bubrega u ljudi i miševa kako bismo otkrili zašto dolazi do nepravilnosti u razvoju. Promatrali smo specifične proteine koji sudjeluju u zaštiti stanica i njihovom „čišćenju“ od oštećenih dijelova. Ovi proteini važni su za normalan razvoj organa, a kada ih nema dovoljno ili su krivo aktivirani, dolazi do bolesti.

U bubrezima djece s urođenim anomalijama otkrili smo značajne promjene u količini i mjestu tih proteina, posebno u displastičnim bubrezima. Ispitujući miševe s genetskom promjenom, potvrdili smo da slični mehanizmi mogu biti odgovorni i kod ljudi. Ova otkrića mogu pomoći liječnicima da bolje razumiju kako i zašto nastaju bolesti bubrega te pridonijeti razvoju novih terapija u budućnosti.

9. SUMMARY

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) represent the leading cause of chronic kidney disease and end-stage renal failure in the pediatric population. Although genetic factors play a central role in CAKUT pathogenesis, the underlying molecular mechanisms remain incompletely understood. This study aimed to investigate the spatiotemporal expression of proteins associated with autophagy and apoptosis in both human fetal kidneys affected by CAKUT and in an experimental mouse model (*yotari*) with *Dab1* gene mutation.

In *yotari* mice, significant dysregulation of all analyzed proteins was observed compared to wild-type controls. LC3B, GRP78, and LAMP2A progressively increased over developmental stages, while AIF exhibited dominant perinuclear localization in renal vesicles. These findings suggest that disruption in autophagy and apoptosis regulation, particularly related to *Dab1* gene dysfunction, may play a key role in CAKUT development and provide potential targets for future diagnostics or therapy.

In the human cohort, kidney tissues from normal and CAKUT-affected fetuses (DU, HYP, DYS, and HK phenotypes) were analyzed using immunohistochemistry and semiquantitative scoring. The most prominent alterations were observed in dysplastic kidneys, with strong perinuclear LC3B expression in distal convoluted tubules (DCT), and a marked signal-reduction of GRP78 in hypoplastic kidneys. HSP70 and LAMP2A showed increased immunoreactivity in DU and DYS phenotypes, indicating a possible compensatory response to cellular stress.

10. LAY SUMMARY

Congenital kidney diseases are among the most common causes of kidney failure in children. In this study, we examined both human and mouse kidneys to understand why these abnormalities develop. We focused on specific proteins that help clean and protect the cells during kidney development. When these protective mechanisms don't work properly, the kidneys may form abnormally, leading to disease.

In fetal kidneys from children with congenital kidney anomalies, we found differences in the presence and activity of these proteins, especially in dysplastic kidneys. We also studied mice with a genetic mutation and observed similar disruptions, suggesting a shared mechanism between animals and humans. Our research highlights the importance of these proteins in healthy kidney formation and may lead to better ways to diagnose or treat kidney disease in the future.

11. LITERATURA

1. Stewart K, Bouchard M. Kidney and urinary tract development: an apoptotic balancing act. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(9):1419-25.
2. Buttyan R, Gobe G. Apoptosis in the mammalian kidney: incidence, effectors, and molecular control in normal development and disease states. *Adv Pharmacol.* 1997;41:369-81.
3. Ho J. The regulation of apoptosis in kidney development: implications for nephron number and pattern? *Frontiers in pediatrics.* 2014;2:128.
4. TW. S. Langman's medical embryology: Wolters Kluwer; 2015.
5. Correa LP, Gatto FR, Bressani GYS, Lanza K, Simoes ESAC. Nephrogenesis, renal function, and biomarkers in preterm newborns. *Current medicinal chemistry.* 2022;29(23):4097-112.
6. In I. Kidney development, disease, repair and regeneration. San Diego: Academic Press; 2016.
7. de Bakker BS, van den Hoff MJB, Vize PD, Oostra RJ. The pronephros; a fresh perspective. *Integrative and comparative biology.* 2019;59(1):29-47.
8. Vize PD WA, Bard JBL. The kidney: from normal development to congenital disease: Elsevier; 2003.
9. Vize P CT, Wallingford J. Induction, development, and physiology of the pronephric tubules 2003.
10. Schell C, Wanner N, Huber TB. Glomerular development--shaping the multi-cellular filtration unit. *Seminars in cell & developmental biology.* 2014;36:39-49.
11. Ludwig KS, Landmann L. Early development of the human mesonephros. *Anatomy and embryology.* 2005;209(6):439-47.
12. Smith C, Mackay S. Morphological development and fate of the mouse mesonephros. *Journal of anatomy.* 1991;174:171-84.
13. Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Hormone research.* 2007;67(3):142-51.
14. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *The Journal of urology.* 2002;167(1):269-71.
15. B P. Review of medical embryology: Macmillan; 1983.
16. L S. Organogenesis of the kidney. Cambridge: Cambridge University Press; 1987.
17. Moritz KM, Wintour EM. Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr Nephrol.* 1999;13(2):171-8.
18. Cebrian C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA. Morphometric index of the developing murine kidney. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2004;231(3):601-8.
19. Osathanondh V, Potter EL. Development of human kidney as shown by microdissection. Iii. Formation and interrelationship of collecting tubules and nephrons. *Archives of pathology.* 1963;76:290-302.
20. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annual review of cell and developmental biology.* 2006;22:509-29.
21. Upadhyay KK, Silverstein DM. Renal development: a complex process dependent on inductive interaction. *Current pediatric reviews.* 2014;10(2):107-14.
22. Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2012;4(5).
23. Jelena Krmpotić-Nemanić AM, Grković Ivica. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2024.
24. Klatte T, Ficarra V, Gratzke C, Kaouk J, Kutikov A, Macchi V i sur. A literature review of renal surgical anatomy and surgical strategies for partial nephrectomy. *European urology.* 2015;68(6):980-92.

25. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. AORN journal. 1998;68(5):800, 3-16, 19-20; quiz 21-4.
26. Levassort H, Essig M. [The kidney, its anatomy and main functions]. Soins Gerontologie. 2024;29(165):10-20.
27. Yokota E, Kawashima T, Ohkubo F, Sasaki H. Comparative anatomical study of the kidney position in amniotes using the origin of the renal artery as a landmark. Okajimas folia anatomica Japonica. 2005;81(6):135-42.
28. Luiz Junqueira JC. Basic histology: Text & atlas. 11th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2005.
29. Steinhausen M, Endlich K, Wiegman DL. Glomerular blood flow. Kidney international. 1990;38(5):769-84.
30. Treuting PM DS, Montine KS. Comparative anatomy and histology: A mouse, rat, and human atlas: Elsevier Science; 2017.
31. Arthur C. Guyton JEH. Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
32. Histology.siu.edu. Proximal convoluted tubule. 2023; Available from: <https://histology.siu.edu/crr/rnguide.htm>.
33. Chou CL, Marsh DJ. Role of proximal convoluted tubule in pressure diuresis in the rat. The American journal of physiology. 1986;251(2 Pt 2):F283-9.
34. Pannabecker TL. Structure and function of the thin limbs of the loop of Henle. Comprehensive Physiology. 2012;2(3):2063-86.
35. Subramanya AR, Ellison DH. Distal convoluted tubule. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2014;9(12):2147-63.
36. Baldelomar LO LA. Mouse kidney anatomy and physiology. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2024.
37. Sorokin L, Ekblom P. Development of tubular and glomerular cells of the kidney. Kidney international. 1992;41(3):657-64.
38. Bruno V, Muhlig AK, Oh J, Licht C. New insights into the immune functions of podocytes: the role of complement. Molecular and cellular pediatrics. 2023;10(1):3.
39. Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2014;9(9):1627-38.
40. Sands JM, Layton HE. Advances in understanding the urine-concentrating mechanism. Annual review of physiology. 2014;76:387-409.
41. Chambers D HC, Matthews G. Renal regulation of water and electrolyte balance. Basic Physiology for Anaesthetists. Cambridge: Cambridge University Press; 2019. p. 318-28.
42. Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. American journal of physiology Renal physiology. 2003;284(2):F253-66.
43. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. Physiological reviews. 2008;88(2):451-87.
44. Sorensen CM, Leyssac PP, Skott O, Holstein-Rathlou NH. Role of the renin-angiotensin system in regulation and autoregulation of renal blood flow. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2000;279(3):R1017-24.
45. Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. Physiological reviews. 2011;91(2):733-94.
46. Knepper MA, Kwon TH, Nielsen S. Molecular physiology of water balance. The New England journal of medicine. 2015;372(14):1349-58.
47. Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. The American journal of physiology. 1998;274(5):F817-33.

48. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews*. 2007;59(3):251-87.
49. Dantzler WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL. Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(10):1781-9.
50. Sanna-Cherchi S, Westland R, Ghiggeri GM, Gharavi AG. Genetic basis of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(1):4-15.
51. Arora V, Anand K, Chander Verma I. Genetic testing in pediatric kidney disease. *Indian journal of pediatrics*. 2020;87(9):706-15.
52. Kagan M, Pleniceanu O, Vivante A. The genetic basis of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol*. 2022;37(10):2231-43.
53. Kohl S, Habbig S, Weber LT, Liebau MC. Molecular causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Molecular and cellular pediatrics*. 2021;8(1):2.
54. Glassberg KI. Normal and abnormal development of the kidney: a clinician's interpretation of current knowledge. *The Journal of urology*. 2002;167(6):2339-50; discussion 50-1.
55. Jain S, Chen F. Developmental pathology of congenital kidney and urinary tract anomalies. *Clinical kidney journal*. 2019;12(3):382-99.
56. Toka HR, Toka O, Hariri A, Nguyen HT. Congenital anomalies of kidney and urinary tract. *Seminars in nephrology*. 2010;30(4):374-86.
57. Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(10):791-802.
58. Yosypiv IV. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? *International journal of nephrology*. 2012;2012:909083.
59. Nigam A, Knoers N, Renkema KY. Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT. *Seminars in cell & developmental biology*. 2019;91:104-10.
60. Sanna-Cherchi S, Sampogna RV, Papeta N, Burgess KE, Nees SN, Perry BJ i sur. Mutations in DSTYK and dominant urinary tract malformations. *The New England journal of medicine*. 2013;369(7):621-9.
61. Nakai H, Asanuma H, Shishido S, Kitahara S, Yasuda K. Changing concepts in urological management of the congenital anomalies of kidney and urinary tract, CAKUT. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2003;45(5):634-41.
62. Rasouly HM, Lu W. Lower urinary tract development and disease. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2013;5(3):307-42.
63. Westland R, Schreuder MF, Ket JC, van Wijk JA. Unilateral renal agenesis: a systematic review on associated anomalies and renal injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(7):1844-55.
64. Uy N, Reidy K. Developmental genetics and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Journal of pediatric genetics*. 2016;5(1):51-60.
65. Mulder J, Sharmin S, Chow T, Rodrigues DC, Hildebrandt MR, D'Cruz R i sur. Generation of infant- and pediatric-derived urinary induced pluripotent stem cells competent to form kidney organoids. *Pediatric research*. 2020;87(4):647-55.
66. van de Hoek G, Nicolaou N, Giles RH, Knoers NV, Renkema KY, Bongers EM. Functional models for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nephron*. 2015;129(1):62-7.

67. Nakanishi K, Yoshikawa N. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2003;45(5):610-6.
68. Farrugia MK. Fetal bladder outflow obstruction: Interventions, outcomes and management uncertainties. *Early human development*. 2020;150:105189.
69. Nicolaou N, Renkema KY, Bongers EM, Giles RH, Knoers NV. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nature reviews Nephrology*. 2015;11(12):720-31.
70. Kamath N, Iyengar AA. Chronic kidney disease (CKD): An observational study of etiology, severity and burden of comorbidities. *Indian journal of pediatrics*. 2017;84(11):822-5.
71. Atiyeh B, Husmann D, Baum M. Contralateral renal abnormalities in multicystic-dysplastic kidney disease. *The Journal of pediatrics*. 1992;121(1):65-7.
72. Atiyeh B, Husmann D, Baum M. Contralateral renal abnormalities in patients with renal agenesis and noncystic renal dysplasia. *Pediatrics*. 1993;91(4):812-5.
73. Robitaille P, Mongeau JG, Lortie L, Sinnassamy P. Long-term follow-up of patients who underwent unilateral nephrectomy in childhood. *Lancet*. 1985;1(8441):1297-9.
74. Kommareddy A, Vagha K, Vagha JD, Javvaji CK, Taksande A, Meshram RJ i sur. A study of clinical profile of congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT) in a tertiary care center. *Cureus*. 2024;16(7):e63766.
75. Steflea RM, Jammula G, Kanka A, Streian CG, Bratosin F, Roberta AC i sur. Assessment of kidney function discrepancies in pediatric CAKUT patients using bedside schwartz equation and renal scintigraphy. *Diseases*. 2024;12(11).
76. Hiraoka M. Medical management of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2003;45(5):624-33.
77. Sanderson KR, Shih WV, Warady BA, Claes DJ. Severe fetal CAKUT (congenital anomalies of the kidneys and urinary tract), prenatal consultations, and initiation of neonatal dialysis. *American journal of perinatology*. 2024;41(S 01):e156-e62.
78. Yan LJ. Folic acid-induced animal model of kidney disease. *Animal models and experimental medicine*. 2021;4(4):329-42.
79. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine*. 2013;110(3):207-11.
80. Dalmasso C, Maranon R, Patil C, Moulana M, Romero DG, Reckelhoff JF. 20-HETE and CYP4A2 omega-hydroxylase contribute to the elevated blood pressure in hyperandrogenemic female rats. *American journal of physiology Renal physiology*. 2016;311(1):F71-7.
81. Chen CC, Wang KY, Shen CK. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(13):9084-91.
82. Ramachandran SA, Jadhavar PS, Singh MP, Sharma A, Bagle GN, Quinn KP i sur. Discovery of pyrazolopyrimidine derivatives as novel inhibitors of ataxia telangiectasia and rad3 related protein (ATR). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2017;27(4):750-4.
83. Shannon EE, Porcu P, Purdy RH, Grant KA. Characterization of the discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005;314(2):675-85.
84. Yamaoka Y, Imai K, Shiomi A, Kagawa H, Hino H, Yamakawa Y i sur. Endoscopic resection of T1 colorectal cancer prior to surgery does not affect surgical adverse events and recurrence. *Surgical endoscopy*. 2020;34(11):5006-16.

85. Liang J, Liu Y. Animal models of kidney disease: Challenges and perspectives. *Kidney* 2023;4(10):1479-93.
86. Challenor R, Metters L. South-west regional patient satisfaction survey. *International journal of STD & AIDS*. 2012;23(12):897-900.
87. Ding SL, Liu W, Iliuk A, Ribot C, Vallet J, Tao A i sur. The tig1 histone deacetylase complex regulates infectious growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant cell*. 2010;22(7):2495-508.
88. Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T i sur. A novel neurological mutant mouse, yotari, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/reelin. *Neuroscience research*. 1997;29(3):217-23.
89. Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H i sur. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*. 1996;379(6561):168-71.
90. Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K i sur. Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature*. 1997;389(6652):730-3.
91. D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 1995;374(6524):719-23.
92. Yoshihara Y, Setsu T, Katsuyama Y, Kikkawa S, Terashima T, Maeda K. Cortical layer V neurons in the auditory and visual cortices of normal, reeler, and yotari mice. *The Kobe journal of medical sciences*. 2010;56(2):E50-9.
93. Aoki T, Setsu T, Okado H, Mikoshiba K, Watanabe Y, Terashima T. Callosal commissural neurons of *Dab1* deficient mutant mouse, yotari. *Neuroscience research*. 2001;41(1):13-23.
94. Akahane A, Kunugi H, Tanaka H, Nanko S. Association analysis of polymorphic CGG repeat in 5' UTR of the reelin and *VLDLR* genes with schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2002;58(1):37-41.
95. Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militeri R, Bravaccio C i sur. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular psychiatry*. 2001;6(2):150-9.
96. Goes FS, Willour VL, Zandi PP, Belmonte PL, MacKinnon DF, Mondimore FM i sur. Sex-specific association of the Reelin gene with bipolar disorder. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2010;153B(2):549-53.
97. Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P i sur. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(3):1281-6.
98. Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T i sur. The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nature genetics*. 1995;10(1):77-83.
99. Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1997;210(2):157-72.
100. Racetin A, Juric M, Filipovic N, Solic I, Kosovic I, Glavina Durdov M i sur. Expression and localization of *DAB1* and Reelin during normal human kidney development. *Croatian medical journal*. 2019;60(6):521-31.

101. Khialeeva E, Carpenter EM. Nonneuronal roles for the reelin signaling pathway. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2017;246(4):217-26.
102. Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740-3.
103. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:77-88.
104. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T i sur. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*. 2000;19(21):5720-8.
105. Zhang Y, Wang L, Meng L, Cao G, Wu Y. Sirtuin 6 overexpression relieves sepsis-induced acute kidney injury by promoting autophagy. *Cell Cycle*. 2019;18(4):425-36.
106. Pajares M, Rojo AI, Arias E, Diaz-Carretero A, Cuervo AM, Cuadrado A. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy*. 2018;14(8):1310-22.
107. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(6):365-81.
108. Zhang J, Johnson JL, He J, Napolitano G, Ramadass M, Rocca C i sur. Cystinosin, the small GTPase Rab11, and the Rab7 effector RILP regulate intracellular trafficking of the chaperone-mediated autophagy receptor LAMP2A. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(25):10328-46.
109. Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(56):9041-7.
110. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2019;20(11):665-80.
111. Mazzei L, Manucha W. Growing evidence suggests WT1 effects in the kidney development are modulated by Hsp70/NO interaction. *Journal of nephrology*. 2017;30(1):11-8.
112. Ma N, Xu N, Yin D, Zheng P, Liu W, Wang G i sur. Levels of circulating GRP78 and CHOP in endoplasmic reticulum stress pathways in Chinese type 2 diabetic kidney disease patients. *Medicine*. 2021;100(33):e26879.
113. Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(12):2545-79.
114. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM i sur. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(5):1545-56.
115. Watanabe M, Adachi S, Matsubara H, Imai T, Yui Y, Mizushima Y i sur. Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. *International journal of cancer*. 2009;124(1):55-67.
116. Lozic M, Minarik L, Racetin A, Filipovic N, Saraga Babic M, Vukojevic K. CRKL, AIFM3, AIF, BCL2, and UBASH3A during Human Kidney Development. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(17).
117. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(8):650-2.
118. O'Rahilly R. Guide to the staging of human embryos. *Anatomischer Anzeiger*. 1972;130(5):556-9.
119. Hildebrandt F. Genetic kidney diseases. *Lancet*. 2010;375(9722):1287-95.
120. Loane M, Dolk H, Kelly A, Teljeur C, Greenlees R, Denssem J. Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies

in Europe. Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology. 2011;91 Suppl 1:S31-43.

121. Kelam N, Racetin A, Katsuyama Y, Vukojevic K, Kostic S. Immunohistochemical expression pattern of FGFR1, FGFR2, RIP5, and HIP2 in developing and postnatal kidneys of Dab1(-/-) (yotari) mice. International journal of molecular sciences. 2022;23(4).

122. Lozic M, Filipovic N, Juric M, Kosovic I, Benzon B, Solic I i sur. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and Renin Expression Patterns in Postnatal Kidneys of Dab1-/- (yotari) Mice. International journal of molecular sciences. 2021;22(3).

123. Racetin A, Filipovic N, Lozic M, Ogata M, Gudelj Ensor L, Kelam N i sur. A homozygous Dab1(-/-) is a potential novel cause of autosomal recessive congenital anomalies of the mice kidney and urinary tract. Biomolecules. 2021;11(4).

124. Igarashi P. Transcription factors and apoptosis in kidney development. Current opinion in nephrology and hypertension. 1994;3(3):308-17.

125. Hartleben B, Godel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Kobler S i sur. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. The Journal of clinical investigation. 2010;120(4):1084-96.

126. Cheng YC, Chang JM, Chen CA, Chen HC. Autophagy modulates endoplasmic reticulum stress-induced cell death in podocytes: a protective role. Exp Biol Med (Maywood). 2015;240(4):467-76.

127. Fang L, Li X, Luo Y, He W, Dai C, Yang J. Autophagy inhibition induces podocyte apoptosis by activating the pro-apoptotic pathway of endoplasmic reticulum stress. Experimental cell research. 2014;322(2):290-301.

128. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F. Minimal Change Disease. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2017;12(2):332-45.

129. Koch EAT, Nakhoul R, Nakhoul F, Nakhoul N. Autophagy in diabetic nephropathy: a review. International urology and nephrology. 2020;52(9):1705-12.

130. Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, Dong Z. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. Kidney international. 2012;82(12):1271-83.

131. Jin R, Zhao A, Han S, Zhang D, Sun H, Li M i sur. The interaction of S100A16 and GRP78 activates endoplasmic reticulum stress-mediated through the IRE1alpha/XBP1 pathway in renal tubulointerstitial fibrosis. Cell death & disease. 2021;12(10):942.

132. Quinones QJ, de Ridder GG, Pizzo SV. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. Histology and histopathology. 2008;23(11):1409-16.

133. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T i sur. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. FEBS letters. 2002;514(2-3):122-8.

134. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. Molecular and cellular biology. 2006;26(15):5688-97.

135. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. The Journal of biological chemistry. 2006;281(11):7260-70.

136. Mimura N, Yuasa S, Soma M, Jin H, Kimura K, Goto S i sur. Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP. Molecular and cellular biology. 2008;28(1):293-301.

137. Shu S, Zhu J, Liu Z, Tang C, Cai J, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress is activated in post-ischemic kidneys to promote chronic kidney disease. EBioMedicine. 2018;37:269-80.

138. Yan M, Shu S, Guo C, Tang C, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. Annals of medicine. 2018;50(5):381-90.

139. Cuervo AM, Hildebrand H, Bomhard EM, Dice JF. Direct lysosomal uptake of alpha 2-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy. *Kidney international*. 1999;55(2):529-45.
140. Sooparb S, Price SR, Shaoguang J, Franch HA. Suppression of chaperone-mediated autophagy in the renal cortex during acute diabetes mellitus. *Kidney international*. 2004;65(6):2135-44.
141. Zhang J, He J, Johnson JL, Rahman F, Gavathiotis E, Cuervo AM i sur. Chaperone-mediated autophagy upregulation rescues megalin expression and localization in cystinotic proximal tubule cells. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:21.
142. Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(11):4829-40.
143. Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(15):5805-10.
144. Rodriguez-Boulau E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(4):225-42.
145. Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(11):887-901.
146. Ballermann BJ. Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney international*. 2005;67(5):1668-71.
147. Ozyerli-Goknar E, Bagci-Onder T. Epigenetic deregulation of apoptosis in cancers. *Cancers*. 2021;13(13).
148. Bjorkman M, Iljin K, Halonen P, Sara H, Kaivanto E, Nees M i sur. Defining the molecular action of HDAC inhibitors and synergism with androgen deprivation in ERG-positive prostate cancer. *International journal of cancer*. 2008;123(12):2774-81.
149. Budanov AV. Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1679-90.
150. Liu S, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A i sur. alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *The EMBO journal*. 2004;23(22):4506-16.
151. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C i sur. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature genetics*. 1997;15(2):157-64.
152. Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ i sur. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nature genetics*. 1995;9(4):358-64.
153. Chen F. Genetic and developmental basis for urinary tract obstruction. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(9):1621-32.
154. Ichikawa I, Kuwayama F, Pope JCt, Stephens FD, Miyazaki Y. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney international*. 2002;61(3):889-98.
155. Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development*. 2009;136(23):3863-74.
156. Chen ZH, Lam HC, Jin Y, Kim HP, Cao J, Lee SJ i sur. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):18880-5.
157. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.

158. Maglica M, Kelam N, Haque E, Perutina I, Racetin A, Filipovic N i sur. Immunoexpression pattern of autophagy markers in developing and postnatal kidneys of Dab1(-/-)(yotari) mice. *Biomolecules*. 2023;13(3).
159. Bjornson Granqvist A, Ebefors K, Saleem MA, Mathieson PW, Haraldsson B, Nystrom JS. Podocyte proteoglycan synthesis is involved in the development of nephrotic syndrome. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;291(4):F722-30.
160. Garg P, Holzman LB. Podocytes: gaining a foothold. *Experimental cell research*. 2012;318(9):955-63.
161. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*. 2020;19(1):12.
162. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC i sur. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology*. 2011;12(3):222-30.
163. Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H i sur. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *The American journal of pathology*. 2012;180(2):517-25.
164. Cunard R, Sharma K. The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;300(5):F1054-61.
165. Kakkar N, Menon S, Radotra BD. Histomorphology of renal dysplasia--an autopsy study. *Fetal and pediatric pathology*. 2006;25(2):73-86.
166. Hsu CN, Tain YL. Developmental origins of kidney disease: Why oxidative stress matters? *Antioxidants (Basel)*. 2020;10(1).
167. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(19):1564-72.
168. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(8):504-10.
169. Harshman LA, Brophy PD. PAX2 in human kidney malformations and disease. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(8):1265-75.
170. Porteous S, Torban E, Cho NP, Cunliffe H, Chua L, McNoe L i sur. Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. *Human molecular genetics*. 2000;9(1):1-11.
171. Bonsib SM. Renal hypoplasia, from grossly insufficient to not quite enough: Consideration for expanded concepts based upon the author's perspective with historical review. *Advances in anatomic pathology*. 2020;27(5):311-30.
172. Jin X, Riew TR, Kim HL, Kim S, Lee MY. Spatiotemporal expression of GRP78 in the blood vessels of rats treated with 3-nitropropionic acid correlates with blood-brain barrier disruption. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2018;12:434.
173. Barnes JA, Smoak IW. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress. *Anatomy and embryology*. 2000;202(1):67-74.
174. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology*. 2012;22(8):407-17.
175. Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S i sur. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 14):3091-102.
176. Kon M, Kiffin R, Koga H, Chapochnik J, Macian F, Varticovski L i sur. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Science translational medicine*. 2011;3(109):109ra17.
177. Allen EA, Baehrecke EH. Autophagy in animal development. *Cell death and differentiation*. 2020;27(3):903-18.

178. Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature medicine*. 2008;14(9):959-65.
179. Valles P, Jorro F, Carrizo L, Manucha W, Oliva J, Cuello-Carrion FD i sur. Heat shock proteins HSP27 and HSP70 in unilateral obstructed kidneys. *Pediatr Nephrol*. 2003;18(6):527-35.
180. Murer L, Benetti E, Artifoni L. Embryology and genetics of primary vesico-ureteric reflux and associated renal dysplasia. *Pediatr Nephrol*. 2007;22(6):788-97.
181. Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Molina H, Valles P. Angiotensin II type I antagonist on oxidative stress and heat shock protein 70 (HSP 70) expression in obstructive nephropathy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2005;51(6):547-55.
182. Liapis H. Biology of congenital obstructive nephropathy. *Nephron Experimental nephrology*. 2003;93(3):e87-91.

12. KRATKI ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Mirko Maglica

Adresa: Stjepana II. Kotromanića 9, Livno, Bosna i Hercegovina

Telefon: +387 63 075-675; +385 95 3493946

Elektronička pošta: mirko.maglica@gmail.com / mirko.maglica@mef.sum.ba

Državljanstvo: hrvatsko, BiH

Datum i mjesto rođenja: 28. studenog 1996. godine u Livnu

OBRAZOVANJE

2011–2015 **Opća gimnazija**

Opća gimnazija Livno

2015-2021 **Student Medicine**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru

2023. – danas **Poslijediplomski doktorski studij – Biologija novotvorina**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

RADNO ISKUSTVO

08/2021 – 05/2023 Dom Zdravlja Livno, Služba za hitnu medicinsku pomoć

Liječnik u službi HMP i obiteljske medicine

09/2021 – 5/2022 NK Troglav Livno

Liječnik za potrebe nogometnog kluba

02/2022 – danas	Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru Asistent na kolegiju Anatomija čovjeka
11/2022 – danas	Farmaceutski fakultet Sveučilišta u Mostaru Asistent na kolegiju Anatomija čovjeka
11/2022 – 11/2023	Dom Zdravlja Tomislavgrad, Služba za hitnu medicinsku pomoć Liječnik na povremenom i privremenom radu u službi HMP
05/2023 – danas	Županijska Bolnica "Dr. fra Mihovil Sučić" Livno Liječnik na odjelu za Otorinolaringologiju
09/2024 – danas	Županijska Bolnica "Dr. fra Mihovil Sučić" Livno Specijalizant otorinolaringologije (KBC Split)

NAGRADE I PRIZNANJA

2021. – Dekanova nagrada za najbolje studente – **Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru**

2022. – Priznanje za najviše prijevoda s engleskog na hrvatski jezik tijekom 2022. – **Cochrane Croatia**

2023. – Priznanje za najviše prijevoda s engleskog na hrvatski jezik tijekom 2023. – **Cochrane Croatia**

2024. – Priznanje za najviše prijevoda s engleskog na hrvatski jezik tijekom 2024. – **Cochrane Croatia**

PUBLIKACIJE I RADOVI

Knowledge, attitudes and behaviour regarding antibiotic use among general population of Herzegovina region – SaMED International Medical Students' Congress 2021

Maglica M, Grgić S, Jerković-Raguž M, Jakovec S, Marijanović I. Associations of procalcitonin, CRP and NLR with mortality in hospitalized COVID-19 patients in University Clinical Hospital Mostar. Indian J Appl Res. 2022;12:49-51.

Maglica M, Jurčević A, Jurčević B, Miškovi J. Spontaneous pneumothorax in a young male athlete: A case report with review of literature. Indian Journal of Case Reports. 2023;9:26–28.

Maglica M, Kelam N, Haque E, Perutina I, Racetin A, Filipović N, Katsuyama Y, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy Markers in Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*^{-/-}(yotari) Mice. *Biomolecules*. 2023;13:402.

Glibić M, Bedeković L, **Maglica M**, Marijanović I, Vukoja D. Behavioral and Knowledge Patterns Regarding the Use of Antibiotics Among Urban and Rural Population in Bosnia and Herzegovina-a Cross-sectional Study. *Mater Sociomed*. 2023;35:33-41.

Perutina I, Kelam N, **Maglica M**, Racetin A, Ogorevc M, Filipović N, Katsuyama Y, Mišković J, Vukojević K. Disturbances in Switching between Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Characterize Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*^{-/-} (yotari) Mice. *Biomedicines*. 2023;11:1321.

Marijanović I, **Maglica M**, Pravdić D. Values of coagulation parameters in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection at the University Clinical Hospital Mostar. *Annals of Biomedical and Clinical Research*. 2023;2:33-39.

Maglica M, Kasalo-Pešić A, Ćavar V, Šesto A. Relationship between the distance of cardiac arrest location from the emergency medical department and the final outcome of cardiopulmonary resuscitation. *Zdravstveni glasnik*. 2023;9:28-38.

Maglica M, Dragišić V, Perutina I, Mišković J. Gastric Perforation due to Cervical Cancer Metastasis. *J Clin Pract Res* 2024;46:109–12.

Rizikalo A, **Maglica M**, Kelam N, Perutina I, Ogorevc M, Racetin A, Filipović N, Katsuyama Y, Zovko Z, Mišković J, Vukojević K. Unraveling the Impact of *Dab1* Gene Silencing on the Expression of Autophagy Markers in Lung Development. *Life (Basel)*. 2024;14:316.

Maglica M, Kelam N, Perutina I, Racetin A, Rizikalo A, Filipović N, Kuzmić Prusac I, Mišković J, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy-Related Proteins in Human Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. *Int J Mol Sci*. 2024;25:6829.

Perutina I, Kelam N, **Maglica M**, Racetin A, Rizikalo A, Filipović N, Kuzmić-Prusac I, Bošnjak M, Mišković J, Kablar B, Ghahrani N, Vukojević K. Spatiotemporal Distribution of Wnt Signaling Pathway Markers in Human Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract. *Acta Histochemica*. 2025;127:152235.

Batinović F, Sunara D, Pleić N, Košta V, Gulišija J, Paladin I, Hrković Z, **Maglica M**, Đogaš Z. Clinical Features, Video Head Impulse Test, and Subjective Visual Vertical of Acute and Symptom-Free Phases in Patients with Definite Vestibular Migraine. *Biomedicines*. 2025;13:825.