

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

UTJECAJ DOBI I ŠEĆERNE BOLESTI TIP 1 NA IZRAŽAJ BJELANČEVINE MUTS
HOMOLOG 2 U BUBREGU ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Paško Babić, dr. med.

Split, 2023. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

UTJECAJ DOBI I ŠEĆERNE BOLESTI TIP 1 NA IZRAŽAJ BJELANČEVINE MUTS
HOMOLOG 2 U BUBREGU ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Paško Babić, dr. med.

Split, 2023. god.

Najviše hvala mome prijatelju i mentoru, Benjaminu Benzoni!

Hvala prof. dr. sc. Katarini Vukojević, dr. med., na pomoći i savjetima i prof. dr. sc. Liviji Puljak, dr. med. te svima koji su pridonijeli izradi ove disertacije.

Hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima na potpori i ljubavi tijekom svih ovih godina!

Hvala Životu na svemu i radujem se novim životnim izazovima!

Popis kratica

GFB	glomerularna filtracijska barijera
MSH2	mutS homolog 2
DNA	deoksinukleinska kiselina
MMR	engl. <i>mismatch repair system</i>
ROS	engl. <i>reactive oxigen species</i>
NOS	engl. <i>nitrogen oxidative species</i>
MODY	engl. <i>maturity-onset diabetes of the young</i>
LADA	engl. <i>latent autoimmune diabetes in adults</i>
GTE _x	engl. <i>The Genotype-Tissue Expression (GTE_x) project</i>
PCNA	engl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>

Sadržaj

1 UVOD.....	1
1.1 Građa bubrega.....	2
1.2 Replikacija DNA	4
1.3 Popravak DNA.....	5
1.4 Popravak pogrešno sparenih baza (engl. <i>mismatch repair system</i>) – MMR	7
1.5 Regulacija izražaja MSH2	9
1.6 Šećerna bolest tipa 1	9
1.7 Oksidacijski stres	12
1.8 Oksidacijski stres u šećernoj bolesti tipa 1	15
1.9 Oksidacijski stres i MMR	18
1.10 Starenje	18
1.11 Analiza MSH2 u humanom karcinomu bubrega	21
2 HIPOTEZE I CILJEVI RADA	22
3 TVORIVA I POSTUPCI	24
3.1 Štakorski model šećerne bolesti tipa I	25
3.2 Obrada i bojenje tkiva.....	25
3.3 Dobivanje slike i kvantifikacija	26
3.4 Analiza iz transkriptomskih baza podataka humanih tumora	26
3.5 Statistička analiza	27
4 REZULTATI	28
4.1 Dinamika izražaja MSH2 u bubregu zdravoga štakora tijekom starenja.....	29
4.2 Dinamika izražaja MSH2 u bubregu štakora sa šećernom bolesti tipa I tijekom starenja.....	32
4.3 Izražaj MSH2 u humanom karcinomu bubrega	33
5 RASPRAVA	40
5.1 Izražaj MSH2 proteina s obzirom na starenje i tkivni odjeljak	41
5.2 Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 na izražaj MSH2 proteina	42
5.3 Izražaj MSH2 na transkripcijskoj razini u humanom karcinomu bubrega	43
5.4 Implikacije i translacijska vrijednosti istraživanja.....	43
5.5 Ograničenja i nedostaci istraživanja	44
6 ZAKLJUČAK.....	45
7 SAŽETAK	47

8 SUMMARY.....	49
9 LITERATURA	51
10 ŽIVOTOPIS.....	59

1 UVOD

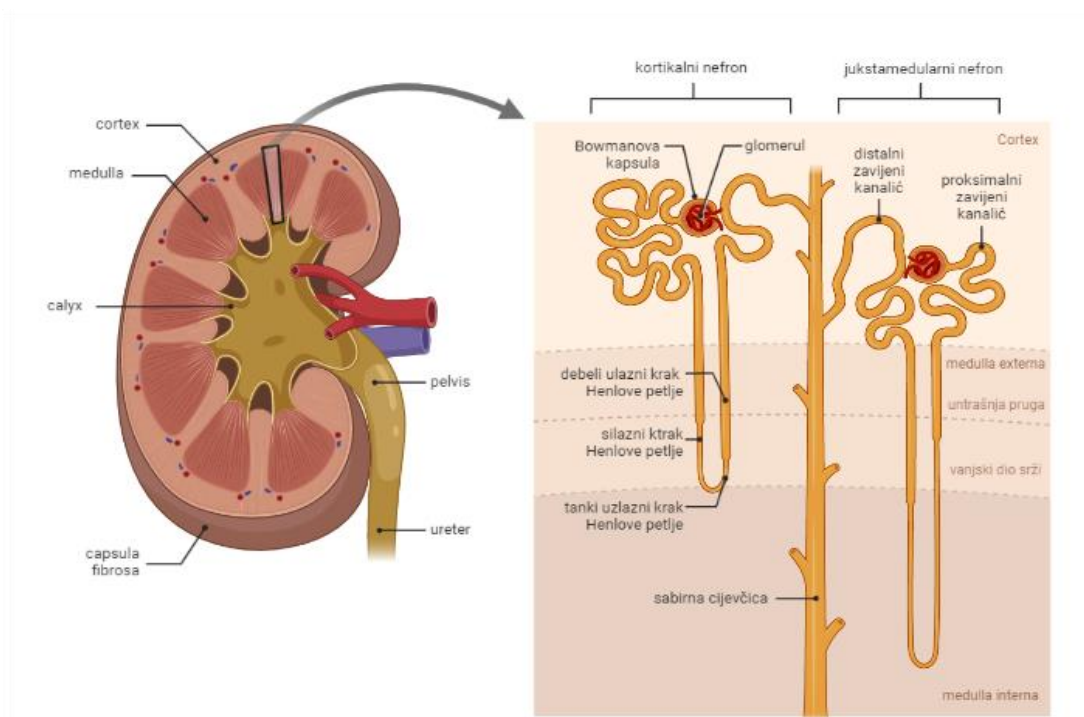
1.1 Građa bubrega

Bubrezi su, uz mokraćovod, mokraćni mjehur i mokraćnu cijev, sastavni dio mokraćnoga sustava (Slika 1). Zaduženi su za homeostazu organizma jer mokraćom odstranjuju otpadne tvari metabolizma, višak vode i iona, reguliraju krvni tlak i sintetiziraju aktivni vitamin D, eritropoetin i renin. Bubreg štakora ima koru i srž koja se sastoji od 10 do 18 čunjastih piramida. Od piramida u koru odlaze sržni tračci građeni od usporednih sabirnih cjevčica. Vrh piramide otvara se u male, a ovi u velike bubrežne vrčeve i nakapnicu, gornji prošireni kraj mokraćovoda (1).

Osnovne funkcionalne jedinice u bubregu su nefroni kojih ukupno ima 1 do 4 milijuna. Svaki se nefron sastoji od bubrežnoga tjelešca (glomerula), proksimalnoga zavijenog kanalića, tankoga i debelog kraka Henleove petlje, distalnoga zavijenog kanalića, sabirnih cjevčica i sabirnih cijevi (1). Glomerul je klupko krvnih kapilara razgranatih između aferentne i eferentne arteriole, uloženo u urinarni prostor omeđen glomerularnom čahuricom. Jednoslojni pločasti epitel tvori parijetalni list glomerularne čahure. Visceralni list tvore podociti čiji su primarni i sekundarni izdanci, tzv. nožice isprepleteni i usidreni u glomerularnu bazalnu membranu. Glomerularnu filtracijsku barijeru (GFB) čini fenestrirani endotel, glomerularna bazalna membrana i pukotinasta opna nefrina razapeta između susjednih nožica podocita. Ultrafiltrat se preko GFB cijedi u Bowmanov prostor i na urinarnom polu ulijeva u proksimalni kanalić (1). Proksimalni kanalići obloženi su cilindričnim epitelom koji ima četkastu prevlaku i apikalne kanaliće, što omogućava apsorpciju makromolekula i tubularnu sekreciju (1). Henleova petlja ima debeli i tanki dio silaznoga kraka i tanki i debeli dio uzlaznoga kraka. Epitel debelih dijelova građom nalikuje epitelu distalnoga zavijenog kanalića, a epitel tankih dijelova jednoslojni je pločasti epitel. Jukstamedularni nefroni imaju dugu Henleovu petlju koja ulazi duboko u srž. Selektivna resorpcija vode iz silaznoga kraka Henleove petlje u *vasa recta* i nemogućnost resorpcije vode u uzlaznome debelom kraku predstavljaju učinkoviti mehanizam za stvaranje gradijenta kortikomedularne hipertoničnosti koja je preduvjet za koncentriranje mokraće (1). Distalni kanalići obloženi su jednoslojnim kubičnim epitelom i važni za regulaciju acidobazne ravnoteže i homeostazu elektrolita, ponajviše djelovanjem aldosterona. Dio aferentne arteriole u vaskularnome hilusu glomerula zajedno s tamnom pjegom u distalnome zavijenom kanaliću tvore jukstaglomerularni aparat koji je važan za regulaciju glomerularne filtracije i krvni tlak. U slučaju niske koncentracije natrija u filtratu u distalnome kanaliću jukstaglomerularne stanice izlučuju renin koji preko

angiotenzina potiče sintezu aldosterona, a taj hormon resorpcijom natrija i vode povisuje krvni tlak (1). Sabirne cjevčice obložene su kubičnim epitelom. Njihovim međusobnim udruživanjem nastaju ravne sabirne cijevi koje se proširuju do vrhova piramida. Epitel sabirnih cijevi pod utjecajem je antidiuretskoga hormona i sudjeluje u koncentriranju mokraće (1).

Bubrežni epitel u neprestanom je obrtaju, dio se stanica dijeli, a dio umire apoptozom (2, 3). Stanice koje se dijele i obnavljaju bubrežni epitel nalaze se u proksimalnome kanaliću u diferenciranom stanju, tj. imaju morfologiju epitelnih stanica bubrega (4). U štakora je obrtaj stanica u bubregu toliki da se sav epitel zamijeni za tri mjeseca (3).



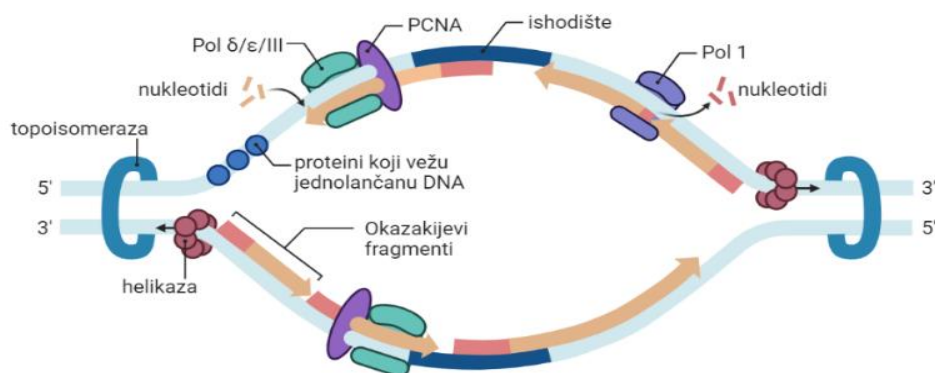
Slika 1. Prikaz anatomije bubrega i djelova kortikalnog i jukstamedularnog nefrona (nacrtano u BioRenderu).

1.2 Replikacija DNA

DNA je nositelj genetičkoga materijala. Ima oblik dvostruke uzvojnice povezane vodikovim vezama između nasuprotnih nukleotida. Dva lanca molekule DNA komplementarni su u slijedu nukleotida i usmjereni u suprotnome smjeru. Četiri različita monomerna nukleotida sadrže purinske (adenin i gvanin) ili pirimidinske (citozin i timin) baze, vezane za šećer deoksiribozu i fosfatnu skupinu. Susjedni nukleotidi povezani su fosfodiesterskom vezom (5, 6).

Autentični prijenos genetičke informacije ključan je u dijeljenju stanice jer omogućuje vjerni prijenos genomske DNA na stanice kćeri. Svakoј diobi prethodi replikacija DNA, odnosno umnažanje genetičkoga materijala u S fazi staničnoga ciklusa. Za sintezu novih komplementarnih lanaca služe roditeljski DNA lanci pa je proces semikonzervativan (5, 6).

Redoslijed nukleotida u novonastalim lancima DNA odraz je komplementarnoga sparivanja baza spram staroga lanca DNA. U tom je procesu ključni enzim DNA polimeraza. U eukariotskim stanicama tri DNA polimeraze sudjeluju u replikaciji jezgrine DNA i jedna u replikaciji mitohondrijske DNA. DNA polimeraza sudjeluje u sintezi novoga lanca DNA u 5'-3' smjeru i može dodavati dNTP samo na prethodno formirani lanac početnice. Iako bi vezivanje baza s obzirom na njihovu komplementarnost moglo rezultirati ugradnjom jedne pogrešne baze na svakih 100 nukleotida novosintetiziranoga lanca, ipak se pogrešno sparivanje baza događa mnogo rjeđe. DNA polimeraza osigurava izvornost pri replikaciji DNA pomoću više mehanizama. Aktivno sudjeluje u izboru odgovarajuće baze i ima korektivnu egzonukleaznu aktivnost. Uz to, postoje dodatni mehanizmi popravka koji uklanjaju pogrešno sparane baze u novom DNA lancu pa je mogućnost pogrešnoga sparivanja baza smanjena na otprilike jednu pogrešku na svakih 10^9 - 10^{10} ugrađenih nukleotida (Slika 2) (5).



Slika 2. Prikaz replikacije DNA. Da bi replikacija DNA započela, superuzvojnice i dvostruka uzvojnica moraju se „raspetljati“, a te procese kataliziraju topoizomeraza i helikaza. Replikacija DNA počinje na slijedovima nukleotida koji označavaju ishodište i posredovana je DNA polimerazom III i PCNA. DNA polimeraza katalizira sintezu DNA od 5' prema 3' kraju novosintetiziranoga lanca pa se na zaostajućem lancu replikacija odvija pomoću Okazakijevih fragmenata. To su kratki, novosintetizani DNA fragmenti od 100-200 nukleotida razdvojeni s 10-nukleotida dugim RNA početnicama, a kad se one odvoje, ligaza poveže Okazakijeve fragmente u kontinuirani novosintetizani komplementarni lanac (nacrtano u BioRenderu).

1.3 Popravak DNA

Sekvencijski 5'-3' poredak nukleotida u lancu DNA predstavlja uputu za poredak aminokiselina u proteinu. Pri transkripciji se genetička informacija upisana u DNA kopira u mRNA, a potom u procesu translacije genetički kod prevodi u aminokiseline (5). Stvoreni proteini određuju specifičnost stanice. Oni su po svojoj ulozi strukturni proteini ili regulatorni proteini, kao npr. enzimi, stanični receptori ili unutarstanični signalni proteini (6). Svaka aminokiselina određena je redosljedom tri nukleotidna monomera, tzv. tripletnim kodonom. Postoje 22 aminokiseline, neke šifrirane s više tripletnih kodona, ali svaki kodon određuje samo jednu aminokiselinu.

U eukariotskim je stanicama DNA uglavnom u jezgri, a mali dio otpada na mitohondrijsku DNA. U stanici je DNA u kompleksu s proteinima, u tzv. kromatinu koji je osnovna jedinica kromosoma. Kromatin se sastoji od dvostruke uzvojnice DNA i pet vrsta proteina koji se nazivaju histoni (5).

Tijekom evolucije razvili su se mehanizmi koji osiguravaju genomsku cjelovitost jer bi promjene u strukturi DNA mogle zaustaviti replikaciju, transkripciju i ugroziti vjernost replikacije. Mutacije mogu nastati tijekom replikacije DNA ili u formiranoj molekuli DNA, spontano ili kao posljedica izloženosti egzogenom mutagenu. Mehanizmi popravka DNA dijele se u dvije glavne skupine – u prvoj se oštećena DNA izravno popravavlja, a u drugoj se postupkom izrezivanja uklanja oštećena baza (5).

Primjer izravnog popravka pirimidinski su dimeri spojeni ciklobutanskim prstenom koji nastaju izlaganjem UV svjetlu, a procesom fotoreaktivacije vraćaju se u prvobitno stanje. Drugi su primjer alkilirani gvaninski ostaci modificirani dodavanjem metilne ili etilne skupine. Oni se kao mutagena kemijska modifikacija uklanjaju djelovanjem enzima O-6-metilgvanin-metiltransferaze (5).

Popravak izrezivanjem (ekscizijom) podrazumijeva prepoznavanje i uklanjanje oštećenoga dijela molekule DNA. Poznata su tri tipa popravka izrezivanjem: izrezivanje baza, izrezivanje nukleotida i popravak pogrešno sparenih baza. U procesu izrezivanja baza, DNA glikozilaza prekida vezu između pogrešno sparene baze i deoksiriboze, a u nastalu pukotinu ugradi se odgovarajuća baza djelovanjem DNA polimeraze i ligaze. U popravku DNA izrezivanjem nukleotida, oštećenje se uklanja u obliku oligonukleotida. U popravku pogrešno sparenih baza tijekom replikacije sudjeluju proteini MMR sustava (5, 6).

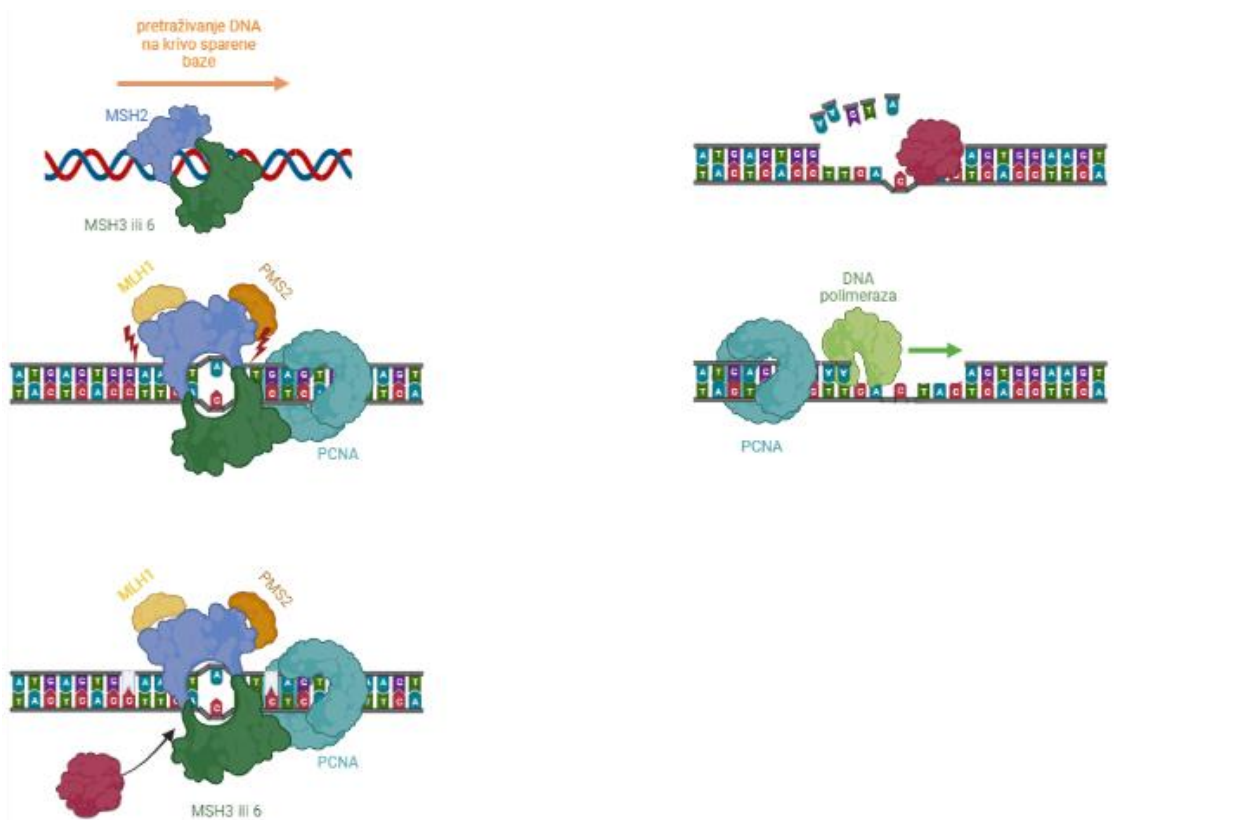
1.4 Popravak pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair system*) – MMR

MMR je visoko konzervirani sustav čiji je obrazac djelovanja vrlo sličan u prokariotskim i eukariotskim stanicama (7). MMR je najučinkovitiji u popravljanju pogrešno sparenih baza, ali je uključen i u ispravljanje pogrešaka u inserciji i deleciji baza tijekom replikacije ili rekombinacije (8). Pogrešno sparivanje baza tijekom replikacije uvijek nastaje na novosintetiziranome lancu, a popravak se odvija u replikacijskoj i u poslijereplikacijskoj fazi. DNA oštećenja rezultat su izlaganja egzogenim mutagenima i gomilanju endogenih reaktivnih metabolita, uključujući kisikove i dušikove reaktivne spojeve (ROS i NOS) (9 – 13).

U eukariota glavnu ulogu u MMR sustavu igraju MSH proteini koji su paralela MutS kompleksu u prokariota. Postoji više vrsta MSH proteina, a međusobno stvaraju dva dimera: MutS α i MutS β . Dimer hMutS α sačinjavaju MSH2 i MSH6 i njegova je uloga otkivanje oštećenja DNA. Dimer hMutS β sačinjavaju MSH2 i MSH3 i uključen je u popravljanje oštećenja DNA nastalih zbog insercije ili delecije (8).

MutS homolog 2 (MSH2), kodiran *MSH2* genom na drugom kromosomu, ključan je u mehanizmu popravka pogrešno sparenih baza. Ubraja se u tumorsupresor gene i to u skupinu gena skrbnika (engl. *caretaker genes*) zaduženih za stabilnost genoma. Produkti tih gena sudjeluju u otkrivanju oštećenja DNA nakon/tijekom replikacije i sprečavaju nastanak mutacija (14). MSH2 protein aktivan je u različitim popravcima DNA, uključujući homolognu rekombinaciju. Mutacije *MSH2* gena povezane su s mikrosatelitnom nestabilnošću jer se zbog gomilanja pogrešno sparenih baza stvaraju novi mikrosatelitni fragmenti. Mikrosatelitna DNA ponavljaća je sekvenca DNA sastavljena od jednog do šest parova baza, najčešće dinukleotida GT/CA s tipičnim ponavljanjem do 50 puta, u nekodirajućim djelovima DNA. Mikrosatelitne regije imaju veći mutacijski potencijal (9).

MLH proteini homolozi su s MutL kompleksom u prokariota. Četiri MutL homologa MLH1, MLH3, PMS1 i PMS2 u eukariota tvore tri dimera MutL α (MLH1-PMS1), MutL β (MLH1-PMS1), MutL γ (MLH1-MLH3) (8). MutL homolozi u interakciji s MutS homolozima promiču daljnji popravak DNA jer omogućuju spajanje dodatnih proteina za popravak oštećene DNA (PCNA, RPA, ExoI) (Slika 3) (5, 10).



Slika 3. Prikaz sustava za popravak pogrešno sparenih baza. Dimer MSH2/MSH6 pretražuje dvostruku uzvojniju na pogrešno sparene baze. Kad ih nađe, na MSH2/MSH6 dimer regrutiraju se MLH1 i PMS2 koji imaju endonukleaznu aktivnost. Nakon izrezivanja nukleotida oko pogrešno sparenih baza, egzonukleaza (EXO1) izreže dio lanca s pogrešno sparenom bazom i slijedi ponovna sinteza lanca DNA. PCNA, jezgrin antigen proliferirajuće stanice (naslikano u BioRenderu).

1.5 Regulacija izražaja MSH2

Stanični ciklus u eukariotskim stanicama dijeli se na mitozu i interfazu. U interfazi G1 faza predstavlja metabolički aktivnu stanicu i kontinuirani stanični rast, S faza označava sintezu DNA, a dovršenjem S faze nastupa G2 faza u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina kao priprema za ulazak u mitozu (5). U eukariota pri kraju G1 faze postoji kontrolna restriksijska točka u kojoj se provjerava adekvatnost veličine stanice i prisutnost izvanstaničnih signala, hranjivih tvari i čimbenika rasta. Ako prođe restriksijsku točku, stanica nepovratno ide u daljnji stanični ciklus, a ako ne prođe ulazi u G0 fazu u kojoj je slabija metabolička aktivnost i manja sinteza proteina, a stanični rast zaustavljen. Iz G0 faze stanica može izaći ako se okoliš promjeni i steknu uvjeti (5).

Stanični ciklus vrlo je koordinirani i pažljivo kontrolirani proces s više kontrolnih točaka. U svakom se dijelu staničnoga ciklusa provjerava cjelovitost i vjernost prepisivanja genoma. U kontrolnoj točki G1 faze moguć je popravak oštećenja prije ulaska u S fazu. U S fazi kontrolna točka omogućuje popravak oštećenja kao što su ugradnja pogrešne baze ili nepotpuna replikacija. U popravak je uključen MMR mehanizam sa svojim sastavnicama. Najznačajnija je provjera u G2 fazi u kojoj se stanični ciklus zaustavlja i ne dopušta napredovanje prema mitozu ako se dogodilo oštećenje ili nereplikacija DNA. Brojna istraživanja dokazala su ulogu MSH2 u toj kontrolnoj točki jer smanjeni izražaj MSH2 dopušta napredovanje prema mitozu unatoč nepopravljenom oštećenju (5, 12, 15, 16).

1.6 Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 kronični je poremećaj metabolizma ugljikohidrata, proteina i masti zbog apsolutnoga ili relativnoga manjka inzulina. U toj multifaktorijskoj bolesti važnu ulogu igraju genetski i okolišni čimbenici, a glavno je obilježje hiperglikemija (Slika 4) (17).

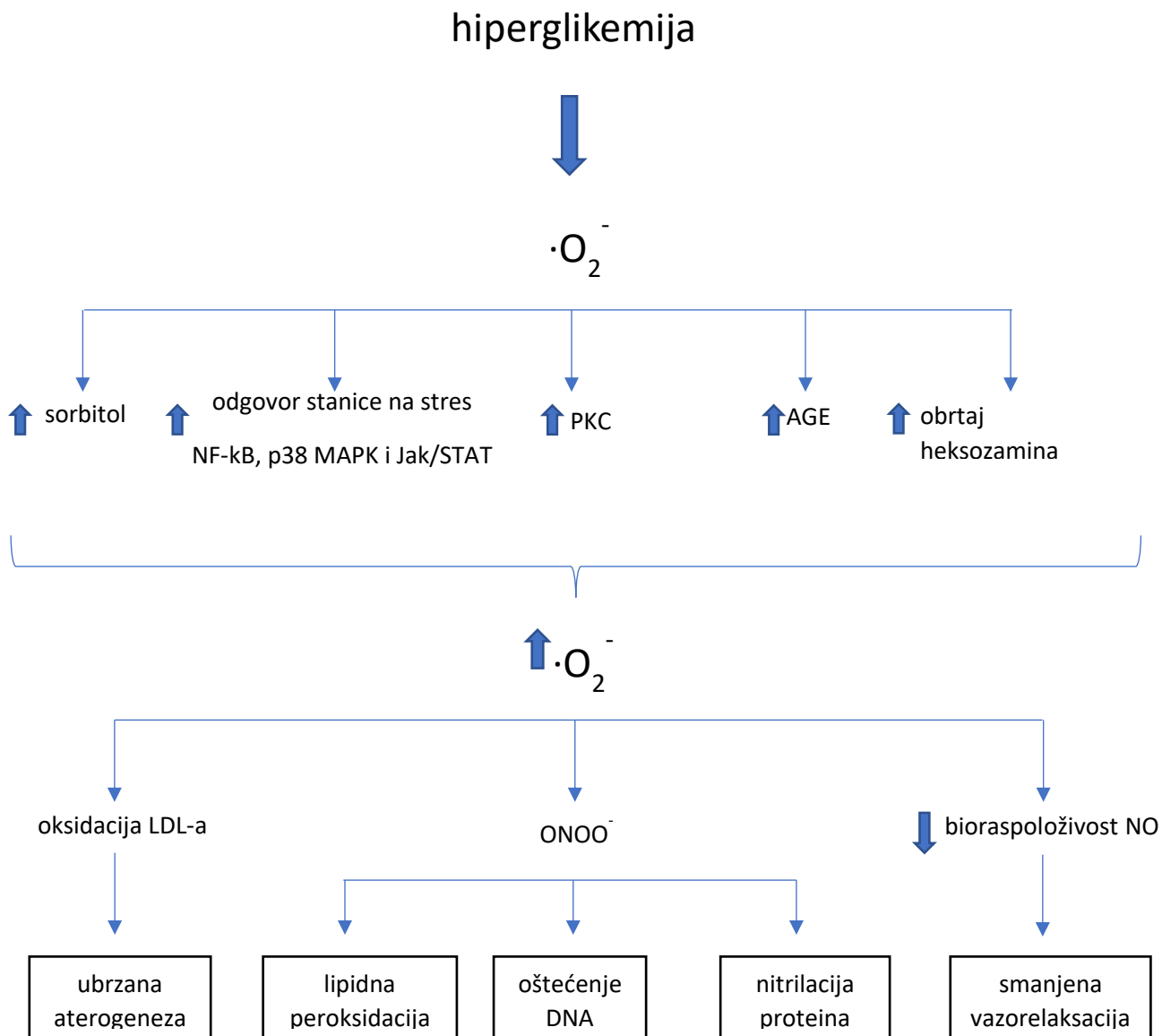
Četiri su tipa šećerne bolesti: tip 1, tip 2, gestacijska šećerna bolest i ostali specifični oblici kao što su MODY (engl. *maturity-onset diabetes of the young*) i LADA (engl. *latent autoimmune diabetes in adults*) (17).

U Hrvatskom nacionalnom registru osoba sa šećernom bolešću 2019. god. registrirano je 300 000 ljudi, a procjenjuje se da ih je čak 450 000, od čega 10 % ima šećernu bolest tipa 1.

Šećerna bolest tipa 1 nastaje zbog autoimune destrukcije β stanica u Langerhansovim otočićima, interakcijom nepoznatih okolišnih čimbenika u genetski predisponiranih osoba. Histološki su Langerhansovi otočići upalno promjenjeni (inzulinitis), infiltrirani CD4 i CD8 T limfocitima, B limfocitima, NK stanicama i makrofagima. Hiperglikemija se očituje kad je razoreno više od 80 % β stanica koje izlučuju inzulin. Često je šećerna bolest tipa 1 udružena s drugim autoimunim bolestima, kao što su Hashimoto tireoiditis, Addisonova bolest, perniciozna anemija i vitiligo. Zbog apsolutnoga manjka inzulina pojačane su lipoliza, proteoliza i bolesnik mršavi. Šećerna bolest tipa 1 očituje se prije 30-e godine života i najčešći je znak bolesti pojava ketoacidoze tijekom infekcije (17).

S nastankom šećerne bolesti tipa 1 povezuje se dvadesetak različitih regija humanog genoma. Tako se haplotipovi DQA1 0301, DQB1 0302 i DQB1 0201 mogu naći u 40 % djece sa šećernom bolesti tipa 1, a samo u 2 % djece u općoj populaciji. Direktni okidač za inzulinitis i nastanak šećerne bolesti tipa 1 nepoznat je, ali se najviše razmatraju virusne infekcije. Autoimuna

upala manifestira se specifičnim autoprotutijelima, inzulinitisom, povećanim peripankreatičnim limfnim čvorovima i povećanom razinom citokina u krvi (17).



Slika 4. Prikaz izvora i nastanka slobodnih kisikovih radikala u hiperglikemiji (AGE- napredni produkti glikacije; PKC- protein kinaza C; LDL- lipoprotein niske gustoće; NO- dušični monoksid).

1.7 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres stanje je neravnoteže između reaktivnih metabolita i antioksidansa koje rezultira smanjenjem antioksidacijske obrane i/ili pretjeranim nagomilavanjem slobodnih radikala u organizmu (Slika 5) (18).

Slobodni radikali nastaju u različitim metaboličkim procesima i imaju vrlo veliku kemijsku reaktivnost zbog nesparenoga elektrona u vanjskome elektronskom omotaču (19). Mogu se spojiti s bilo kojom susjednom molekulom i oduzeti joj vanjski elektron pa nastaju novi slobodni radikali, što može potaknuti lančanu reakciju. Izravno oštećuju stanične strukture, a stanica reagira aktivacijom stresnih signalnih puteva i izražavanjem gena koji se povezuju s nastankom staničnih oštećenja (20).

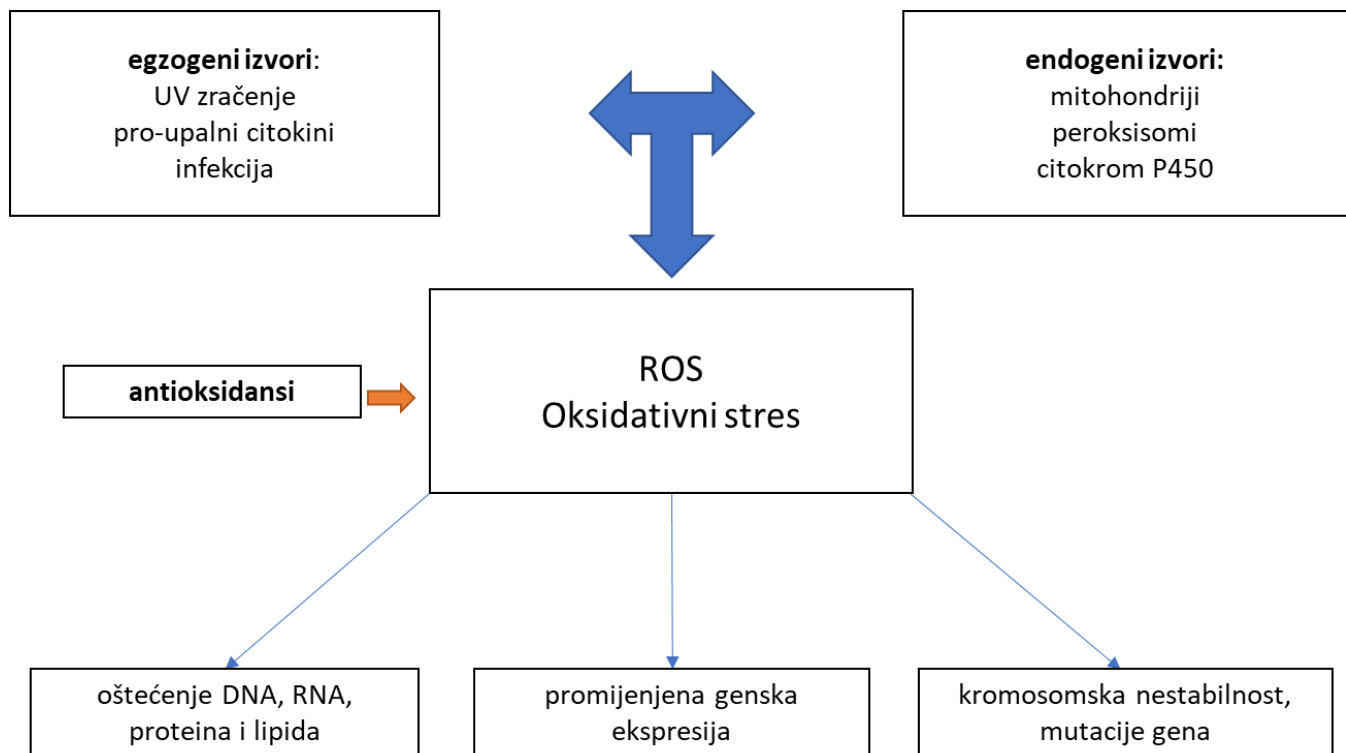
Oksidativna fosforilacija najvažniji je izvor slobodnih radikala koji nastaju od reaktivnih oblika kisika (ROS) ili dušika (RNS). U ROS spadaju radikali kisika i reaktivni neradikalni derivati (superoksidni anion (O_2^-), perhidroksilni radikal (HOO), hidroksilni anion (OH^-), vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina (HClO). U RNS spadaju dušikov II oksid ($NO\cdot$), dušikov (IV) oksid ($\cdot NO_2$), nitrozilni kation (NO^+) i peroksinitrat ($ONOO\cdot$) (19, 21). Zbog prevage reaktivnih radikala, u oksidativnom stresu dolazi do oštećenja nukleinskih kiselina i genskih mutacija, oksidirani proteini gube funkciju, a lipidi zbog lipidne peroksidacije stvaraju reaktivne aldehide. Organizam pokušava osigurati ravnotežu neutraliziranjem slobodnih radikala pomoću sustava antioksidacijske obrane (22).

Antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima i poništavaju njihovo djelovanje. Antioksidansi nastaju endogeno ili se unose hranom i kao dodatak prehrani. Dvije su osnovne skupine: I) antioksidacijski enzimi i II) jednostavne/složene molekule koje izravno sudjeluju u neutralizirajućim procesima slobodnih radikala. U antioksidacijske enzime ubrajaju se superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPx), glutation-reduktaza (GRx) i glutation-oksidaza (GOx) koji pretvaraju slobodne radikale u slabije aktivne/neaktivne molekule i sudjeluju u obnavljanju oštećenje DNA ili proteina. U neenzimski sustav spadaju vitamin A (retinol), vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (alfa- tokoferol), bata-karoten (provitamin A), bilirubin, mokraćna kiselina, glutation, tioli, koenzim Q10, cistein, feritin, transferin, albumin, ceruloplazmin i elementi u tragovima bakar, cink, selen i mangan. Antioksidansi mogu djelovati na više načina: imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, smanjuju lokalnu koncentraciju

kisika, uklanjaju reaktivni kisik, vežu ione željeza i bakra, uklanjaju perokside i prekidaju lanac lipidne peroksidacije (Slika 6) (19).



Slika 5. Prikaz utjecaja oksidacijskoga stresa na različita tkiva.



Slika 6. Prikaz djelovanja slobodnih radikala i posljedica oksidacijskoga stresa (ROS- slobodni kisikovi radikali).

1.8 Oksidacijski stres u šećernoj bolesti tipa 1

Oksidacijski stres važan je čimbenik u patogenezi šećerne bolesti i nastanku njenih komplikacija (23, 24). Hiperglikemija potencira nastanak oksidacijskoga stresa, direktno i indirektno, zbog povećanoga stvaranja ROS i NOS-a (ne)enzimskim procesima u mitohodriju (18, 24). Neenzimski izvori slobodnih radikala potječu iz reakcija u metabolizmu glukoze u koje se ubrajaju oksidativna fosforilacija, autooksidacija glukoze, stvaranje završnih produkata glukoze i aktivacija poliolškoga metaboličkog puta (25). S druge strane, slobodni kisikovi radikali mogu nastati bez hiperglikemije, enzimskim djelovanjem ciklooksigenaza, lipooksigenaza, ksantin oksidaze i NAD(P)H oksidaze (26, 27). Koncentracija slobodnih masnih kiselina povećana je zbog apsolutnoga manjka inzulina i to zbog viška slobodnih radikala stvara oksidacijski stres.

Glukoza i druga metabolička „goriva“ supstrati su u procesu oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima tijekom koje nastaje stanični ATP. Pri tome u fiziološkim uvjetima nastaje mala količina jako reaktivnoga superoksidnog radikala koji se lančano može pretvarati u druge slobodne radikale, ali to sprječavaju mitohondrijska SOD, glutation peroksidaza i katalaza. U oksidacijskome stresu amplificira se količina slobodnih kisikovih radikala i time iscrpljuje antioksidacijska obrana, posebno reducirani glutation kao glavni stanični antioksidans. Oksidacijska fosforilacija najveći je izvor slobodnih radikala u stanju oksidacijskoga stresa.

NF- κ B (nuklearni faktor κ B) proteinski je kompleks koji kontrolira DNA transkripciju, sintezu citokina i stanično preživljavanje pa je ključan u odgovoru na endogeni ili egzogeni podražaj. U hiperglikemiji se zbog oksidacijskoga stresa aktivira NF- κ B. Druga oštećenja DNA, porast koncentracije proupalnih citokina, vezanje kasnih produkata glikozilacije na njihove receptore i aktivacija p38 MAPK i JNK stresnih kinaza, mogu aktivirati NF- κ B, kao što se događa aktivacijom fosforilacijskoga puta. Fosforilacijom inhibicijske podjedinice I- κ B, oslobađa se NF- κ B i u jezgri aktivira gene za čimbenike rasta, citokine, receptore za AGE i adhezijske molekule. Aktivirani signalni put NF- κ B aktivira čimbenik rasta endotela krvnih žila (VEGF), uključen u angiogenezu. Stoga, nefiziološka aktivacija NF- κ B ima veliku ulogu u patogenezi šećerne bolesti (28, 29).

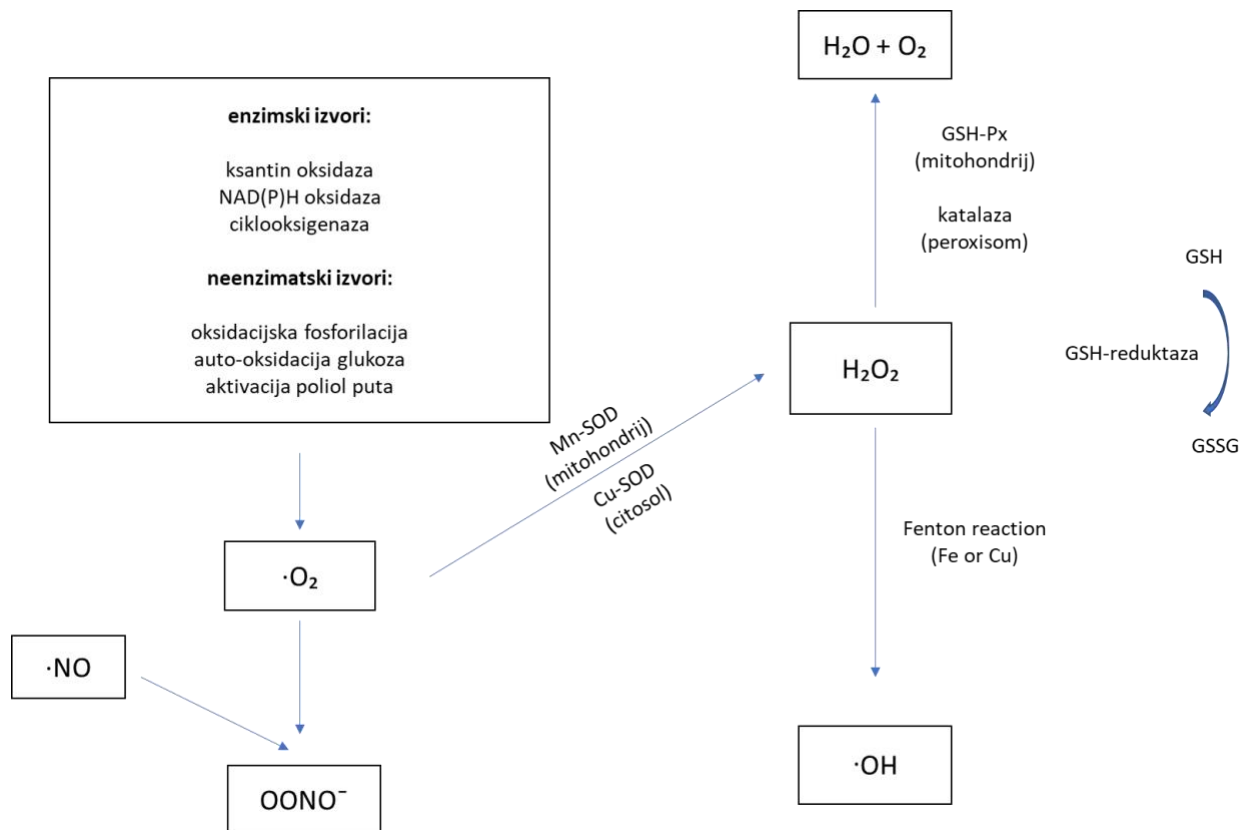
Oksidacijski stres preko slobodnih radikala i upalnih citokina aktivira stresne signalne putove koji mijenjaju transkripciju mnogih proteina. Protein-kinaza najvažniji je stresni signalni

put aktiviran mitogenom jer fosforilacija aktivacijsko-transkripcijskoga čimbenika 2 (ATF-2) vodi stanicu u apoptozu.

Osim toga, hiperglikemija aktivira sljedeće biokemijske reakcije (Slika 4, 7) (28, 30 – 32):

- Nastaju krajnji produkti glikozilacije lipida, proteina i nukleinskih kiselina i to neenzimskim reakcijama glikozilacije; njihovim vezanjem na membranske receptore stvaraju se slobodni kisikovi radikali.
- Aktivira se signalni put protein-kinaze C (PKC) i membrane postaju propusnije.
- Poliolskim metaboličkim putem hiperglikemija aktivira aldoza-reduktazu i glukoza prelazi u sorbitol koji aktivira stresne proteine.
- Hiperglikemija i slobodne masne kiseline u stanici aktiviraju enzim GFAT (glutaminfruktoza-6-fosfat-amidottransferazu) koji katalizira sintezu heksozamina povezanih s inzulinskom rezistencijom.

β stanice vrlo su osjetljive na slobodne radikale jer imaju malo antioksidansa (24). Kronična hiperglikemija i povišena razina slobodnih radikala mogu promijeniti izražaj gena, što rezultira smanjenim lučenjem inzulina i ubrzava apoptozu β stanica (15).



Slika 7. Oksidacijski stres u šećernoj bolesti tipa 1 (GSH- glutation).

1.9 Oksidacijski stres i MMR

Kao i druge kronične upalne bolesti, šećerna bolest tipa 1 izaziva oksidacijski stres, ponajviše nakupljanjem slobodnih radikala (25). Radikali djeluju izravno na genomsku DNA i modificiraju njen izražaj, ali i na proteine koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA (33). Utvrđena je obrnuto proporcionalna povezanost između količine slobodnih radikala i funkcije proteina koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA (9). U literaturi je opisana povezanost između metaboličkih bolesti i gubitka funkcije MLH1 izazvane oksidacijskim stresom (13).

U humanoj patologiji najčešće mutirani geni MMR mehanizma su *MSH2* i *MLH1*, primjerice u Lynch sindromu (hereditarnom nepolipoznom kolorektalnom karcinomu) ili u sporadičnim adenokarcinomima sa somatskom mutacijom (33 – 38). Mutacijom *MSH2* i poslijetranslacijskim oštećenjem *MSH2* dolazi do značajnoga skraćivanja telomera – uzastopno ponavljajućih slijedova na krajevima kromosoma koji su važni za određivanje trajanja života i reproduktivne sposobnosti stanice (15, 39, 40). Patološko skraćivanje telomera dovodi do genomske nestabilnosti i potencira tumorogenezu (41). Relativna duljina telomera (RTL), određena metodom q-PCR (kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze), prediktivni je biljeg za sporadični kolorektalni karcinom.

1.10 Starenje

Neizbježni prirodni proces starenja fiziološka je pojava koja pokazuje individualnu raznolikost. Prema jednoj definiciji, starenje je razvoj jedinke koji započinje u trenutku oplodnje, a prema drugoj definiciji razdoblje ljudskog života nakon 64. godine.

Starenje je progresivno nakupljanje molekularnih oštećenja unutar stanica i tkiva te je obilježeno smanjivanjem fiziološke rezerve i funkcija svih organskih sustava (42). Primjeri su:

- Smanjivanje mišićne i koštane mase.
- Opadanje funkcije pluća nakon 30-e godine života za oko 1 % godišnje u vidu smanjenja vitalnoga kapaciteta, volumena forsiranoga izdisaja, minutnoga volumena i porast funkcijskoga rezidualnog kapaciteta (47).
- Mozak se izraženije mijenja nakon 70. godine života kad se moždana masa smanji za 7 %. Bogat je lipidima, a oni podložni lipidnoj peroksidaciji koja se događa u oksidativnom stresu. Uz to, nakupljaju se oksidirani proteini (48).

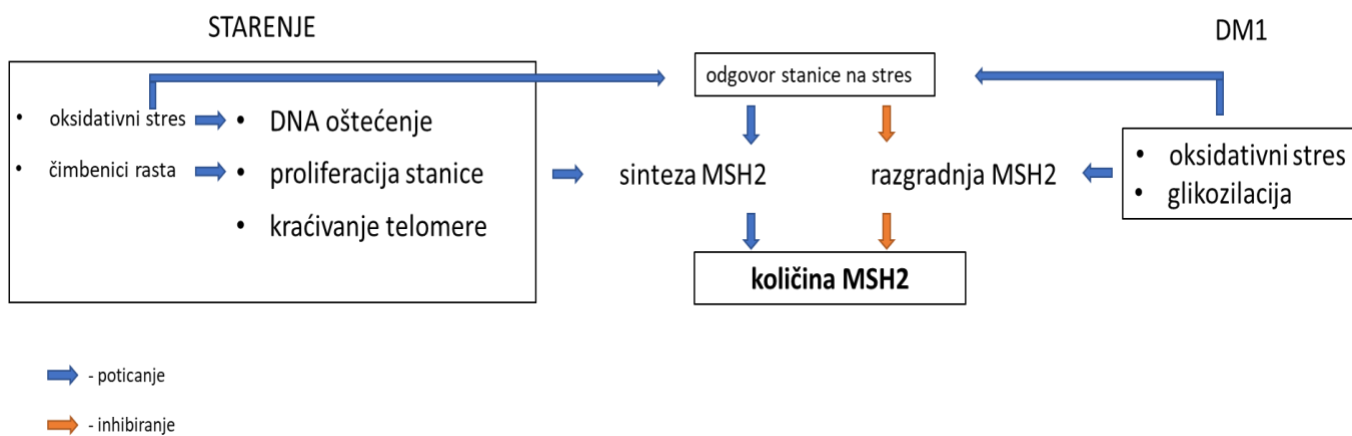
- Kardiomiociti su malobrojniji i hipertrofični. Stijenke krvnih žila rigidnije su, aktivnost autonomnoga živčanog sustava i osjetljivost na baroreceptore smanjena što rezultira ortostatskom hipotenzijom.
- Gušterača luči manje inzulina, na periferiji se stvara inzulinska rezistencija, iz nadbubrežne žlijezde i štitnjače izlučuje se manje aldosterona, odnosno manje hormona štitnjače (23).
- Nakon 40. godine života broj se funkcionalnih nefrona godišnje smanji za 1 %.

O mehanizmu starenja zna se manje nego o morfološkim i funkcionalnim obilježjima koje prate starenje (43). Starenje je pod utjecajem genotipskih i fenotipskih čimbenika i može biti fiziološki i patološki proces. Fenotipska obilježja rezultat su utjecaja genotipa i stila života pojedinca. Studije na jednojajčanim blizancima pokazale su da se dvije trećine raznolikosti (varijabilnosti) duljine života u ljudi mogu objasniti okolišnim čimbenicima, a ostatak je uvjetovan nasljednim obilježjima. Od svih teorija koje pokušavaju objasniti starenje, najobuhvatnija je teorija biološkoga sata (43). Po toj teoriji neuronski krugovi u hipotalamusu prate vrijeme i na temelju protekloga vremena reguliraju rad endokrinoga sustava. Starenje je obilježeno smanjenim lučenjem hormona rasta, adrenokortikotropnoga hormona i gonadotropina pa se govori o somatopauzi, adrenopauzi i andropauzi/menopauzi (43). Adrenopauza je obilježena smanjivanjem razine muških spolnih hormona iz nadbubrežne žlijezde i povezana s povećanom inzulinskom rezistencijom, imunosupresijom i osteoporozom. Somatopauza je obilježena smanjivanjem mišićne i koštane mase i povećanjem mase masnog tkiva. Nadalje, razina hormona rasta izravno je uključena u reguliranje antioksidacijskoga kapaciteta stanice i učinkovitost oksidativne fosforilacije mitohondrija (44). Iz istraživanja starenja na beskralježnjacima poznato je da povećavanje antioksidativnoga kapaciteta organizma produljuje životni vijek. U ljudi su čimbenici rizika za razvoj bolesti i smrti, primjerice pretilost, hiperglikemija, pušenje i kronične upalne bolesti, povezani s povećanim oksidacijskim oštećenjem. Produljenje životnoga vijeka u ljudi koji umjereno redovno konzumiraju vino vjerojatno je povezano s povećanim antioksidacijskim kapacitetom.

Od genetskih bolesti koje uvjetuju starenje, ističe se rijetka bolest progerija. Progerija tipa II ili Wernerov sindrom povezana je s mutacijom gena za DNA helikazu (*RECQL1*) na osmom kromosomu koja je važna u replikaciji i popravku DNA (43).

Starenje i šećerna bolest povezani su sa staničnom proliferacijom i s oksidacijskim oštećenjem (Slika 8). Rezultate pokusa koji su se bavili regulacijom *MSH2* gena i MSH2 proteina *in vitro* teško je ekstrapolirati *in vivo* na životinjskome modelu (Slika 8).

Bilo koje oštećenje proteina na poslijetranslacijskoj razini rezultira popravkom oštećenoga proteina ili njegovom razgradnjom do aminokiselina, nakon koje slijedi sinteza *de novo*.



Slika 8. Prikaz čimbenika koji utječu na sintezu ili razgradnju MSH2 proteina.

1.11 Analiza MSH2 u humanom karcinomu bubrega

Karcinom bubrežnih stanica najčešći je zloćudni tumor bubrega u odraslih. Čini oko 2,5 % svih karcinoma u odrasloj populaciji s prevalencijom oko 16/100 000. Češće se javlja u muškaraca. Nije uobičajen prije 40. godine, a najviša je prevalencija između 65. i 75. godine. Karcinom nastaje iz epitela bubrežnih kanalića. Tri su najčešća tipa karcinoma bubrega svjetlostanični karcinom, papilarni karcinom tipa 1 i tipa 2 i kromofobni karcinom. Razlikuju se po građi, podrijetlu i genskim promjenama. Karcinom bubrega svijetlih stanica najčešći je, ima potencijal širenja u bubrežnu venu i donju šuplju venu, a krvlju metastazira u pluća, kosti, mozak i druge organe. Karcinom bubrežnih stanica može biti sporadični i nasljedni.

2 HIPOTEZE I CILJEVI RADA

Oksidativni stres oštećuje DNA i to izaziva povećanu transkripciju i translaciju *MSH2* gena, ali istovremeno oštećuje MSH2 protein. Zato je u studijama *in vitro* teško predvidjeti izražaj MSH2 i dobivene rezultate ekstrapolirati na uvjete *in vivo*, u kojima postoji utjecaj proliferacije, odnosno čimbenika rasta. U ovoj studiji izražaj MSH2 u starenju i šećernoj bolesti tipa 1 ispitali smo *in vivo* na eksperimentalnom štakorskom modelu, i to na bubregu, organu koji starenjem i u šećernoj bolesti tipa 1 pokazuje morfološke i funkcionalne promjene. Kako karcinom bubrega najčešće nastaje u starijoj dobi, iz javno dostupnih baza mRNA humanoga transkriptoma analizirali smo ima li razlike u mRNA MSH2 u karcinomu bubrega u odnosu na zdravo tkivo te među najčešćim tipovima karcinoma bubrega: svjetlostaničnoga karcinoma, papilarnoga karcinoma i kromofobnoga karcinoma.

Hipoteze:

Izražaj MSH2 u bubrežnom tkivu štakora starenjem se mijenja i u šećernoj bolesti tipa 1 drugačiji je nego u kontrolnoga štakora iste dobi.

Izražaj mRNA *MSH2* manji je u karcinomu bubrega, nego u zdravom bubregu i razlikuje se u tipovima karcinoma bubrega.

Ciljevi studije su:

- 1) analizirati utjecaj starenja na izražaj MSH2 u srži i kori bubrega zdravoga štakora
- 2) analizirati utjecaj starenja na izražaj MSH2 u srži i kori bubrega štakora sa šećernom bolesti tipa 1
- 3) usporediti razlike u izražaju MSH2 u obje kohorte
- 4) usporediti izražaj *MSH2* mRNA u najčešćim tipovima karcinoma bubrega iz javno dostupnih genomskih baza podataka

3 TVORIVA I POSTUPCI

3.1 Štakorski model šećerne bolesti tipa 1

Dvadeset i pet mužjaka štakora uzgojeni su u nastambi za životinje Sveučilišta u Splitu u kontroliranim uvjetima, na temperaturi od 22,1 °C i sa svjetlosnim rasporedom 12 h/12 h. Hranjeni su standardnom laboratorijskom hranom (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i voda im je davana *ad libitum*.

U dvomjesečnih pokusnih štakora šećerna je bolest tipa 1 izazvana intraperitonealnom primjenom streptozocina (STZ; 55 mg/kg), svježe otopljenoga u citratnome puferu (pH 4.5) nakon što su štakori cijelu noć gladovali (45). Kontrolna skupina štakora iste dobi primila je otopinu citratnoga pufera. Za mjesec dana pokusni su štakori pokazali prve komplikacije uzrokovane šećernom bolesti tipa 1 i dosegli nepromjenjivu razinu hiperglikemije iznad 300 mg/dl (45, 46). Formirano je pet skupina: 1. kontrolna skupina u dobi od 2 mjeseca (n = 3), 2. kontrolna skupina u dobi od 8 mjeseci (n = 7), 3. kontrolna skupina u dobi od 14 mjeseci (n = 3), pokusna skupina u dobi od 8 mjeseci (n = 6) i pokusna skupina u dobi od 14 mjeseci (n = 6). U trenutku žrtvovanja životinja, pokusni osmomjesečni štakori imali su 6 mjeseci šećernu bolest tipa 1, a četrnaestomjesečni štakori 12 mjeseci. Jednom mjesečno bila im je mjerena razina glukoze u plazmi glukometrom (One-133TouchVITA, LifeScan, High Wycombe, UK). Iz studije su isključeni pokusni štakori s hiperglikemijom ispod 300 mg/dl. Da bi se spriječio razvoj ketoacidoze, pokusni štakori primali su jednom tjedno parenteralno jednu jedinicu dugodjelujućeg inzulina (Lantus Solostar; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Njemačka).

Protokol pokusa odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Svi su postupci slijedili EU Direktivu (2010/63/EU).

3.2 Obrada i bojenje tkiva

Štakori su anestetizirani izofluranom (Forane, Abbott Laboratories, Queenborough, UK) i perfundirani fiziološkom otopinom i Zamponijevim fiksativom preko lijeve klijetke i uzlazne aorte (47). Bubrezi su ekstirpirani, tkivo fiksirano i dehidrirano te uklopljeno u parafinski blok (48). Izrezani su preparati debljine 5 mikrometara. Nespecifično vezanje blokirano je Protein Blokom (Abcam, Cambridge, UK). Preparati su deparafinirani i rehidrirani te inkubirani s primarnim monoklonalnim mišjim protutijelom na MSH2 (Abcam, Cambridge, UK, razrijeđenje 1:300) preko noći na 4 °C. Potom su preparati isprani i aplicirano je magareće protumišje, sekundarno

protutijelo obilježeno zelenim fluorokromom (AF488, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD, razrijeđenje 1:400). Preparati su isprani i obojeni DAPI-jem (4',6-diamidino-2-fenilindol) (48).

3.3 Dobivanje slike i kvantifikacija

Mikrofotografije su snimljene digitalnom kamerom SPOT Insight (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, SAD) na fluorescentnome mikroskopu Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japan). Postavkama računalnoga programa za prikupljanje slika Cella kamera je ugođena na razlučivost od 1360 x 1024 i ekspoziciju od 1/333, 3 sekunda uz filter za smanjenje šuma. Na vidnome polju srednjega povećanja (200 x) u zelenim i plavim kanalima, snimljeno je po pet mikrofotografija kore i srži. Histogrami intenziteta fluorescencije prikupljeni su za kanal zelene fluorescencije u računalnome programu imageJ (NIH, Bethesda, MD, SAD). Područje pozitivnoga signala određeno je analizom preparata obojenoga samo sekundarnim protutijelom jer se tako kvantificira autofluorescencija i fluorescencija zbog nespecifičnog vezanja sekundarnoga protutijela. Područje pozitivnoga signala isključuje 99 % signala dobivenoga iz histograma intenziteta fluorescencije tih preparata. Izražaj MSH2 kvantificiran je kao površina ispod krivulje (AUC) histograma intenziteta fluorescencije koja bilježi ukupnu površinu pod pozitivnim signalom i intenzitet fluorescencije signala (49). Endogena pozitivna kontrola bila je bubrežno tkivo koje je prema Atlasu izražaja gena i samo MSH2 pozitivno (50). Dinamika izražaja MSH2 analizirana je u oba tkivna odjeljka bubrega, tj. kori i srži (51, 52)

3.4 Analiza iz transkriptomskih baza podataka humanih tumora

Podacima smo pristupili preko mrežne usluge Xena Sveučilišta Santra Cruz iz Kalifornije, SAD. Uključeni su podaci iz Genomskog atlasa raka (engl. TCGA, The Cancer Genome Atlas), obrađeni u usluzi Genomic Data Commons i podaci iz GTEx baze (Broad Institut, Massachusetts, SAD) koji su se odnosili na uzorke humanog karcinoma bubrega. Od svih dostupnih varijabli za karcinom bubrega, u analizu smo uključili broj kopija mRNA *MSH2* gena, klinički stadij, histološki gradus i tip karcinoma bubrega. Kao kontrolu smo uključili transkriptomске podatke dobivene sekvencioniranjem zdravih bubrega dostupne u bazi GTEx. Vrijednosti navedenih varijabli unesene su u program Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD) i statistički analizirane.

3.5 Statistička analiza

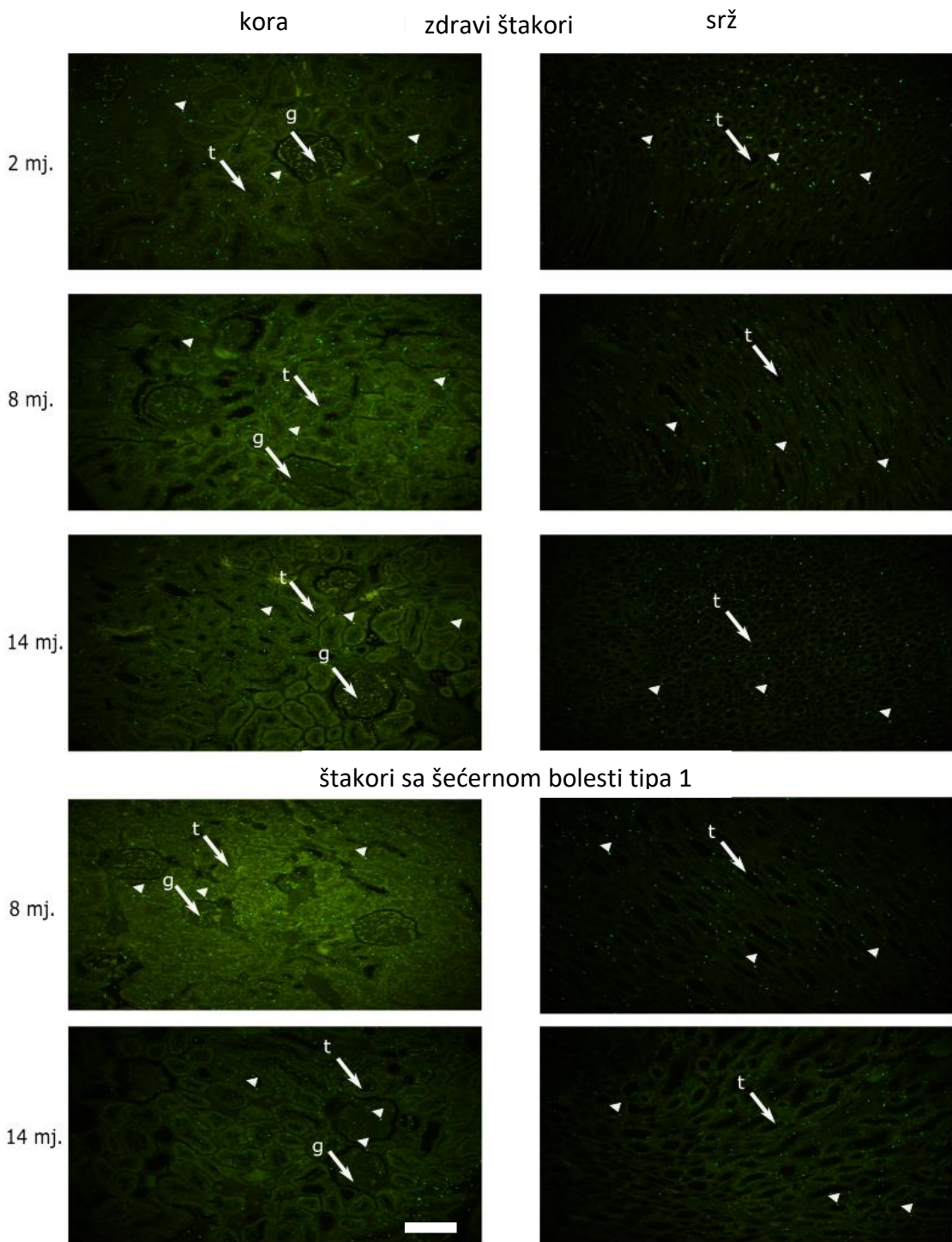
Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška srednje vrijednosti, ako nije drugačije navedeno. Podaci su normalizirani na prosječnu razinu izražaja MSH2 u kontrolnoj skupini staroj dva mjeseca. Razlike među skupinama izražavaju se kao promjena puta (tj. razlika aritmetičkih sredina). Površine ispod krivulja (AUCs) i njihove intervalne procjene izračunate su korištenjem analize AUC u softveru GraphPad Prism 8.0 (Graph Pad, La Jolla, CA, SAD). Kao statistička mjera dokaza korištene su veličina učinka i pripadajući 95 % CI, R^2 (η^2), p-vrijednost i omjeri vjerojatnosti (E) između alternativnih (H_a) i nultih (H_0) hipoteza, tj. modela, temeljen na korigiranom Akaikejevom informacijskom kriteriju (cAIC) (53). Hipoteze su testirane pomoću t-testa, jednosmjerne i trosmjerne ANOVA. Osim toga, p-vrijednosti interpretirane su prema ASA Izjavi o statističkoj značajnosti i p-vrijednostima (54). Sve analize rađene su u softveru GraphPad Prism 8.0. Veličina uzorka izračunata je Meadovom jednadžbom resursa.

4 REZULTATI

4.1 Dinamika izražaja MSH2 u bubregu zdravoga štakora tijekom starenja

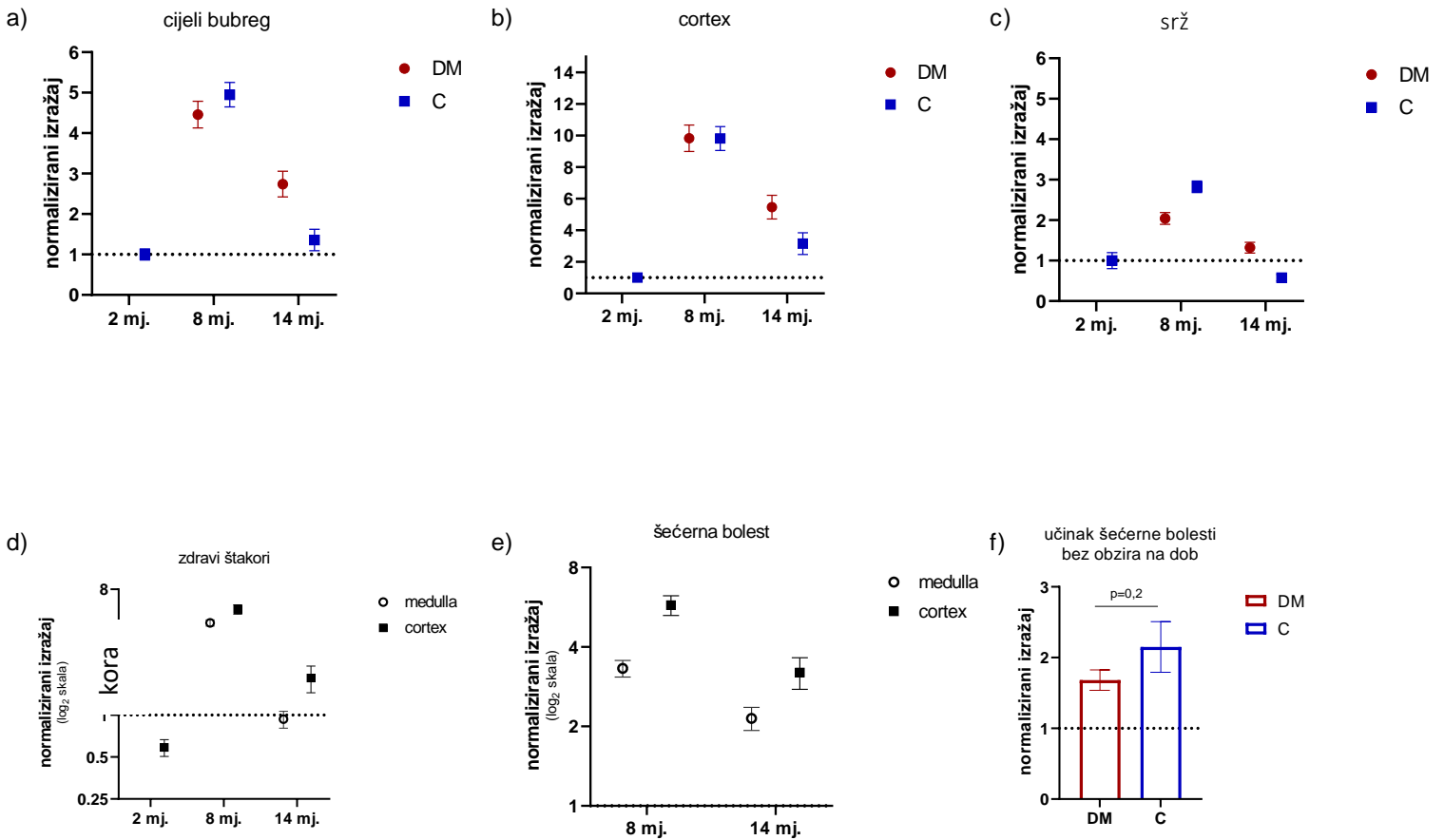
Fluorescentni signal MSH2 u citoplazmi i jezgri stanica bubrega vidi se u obliku diskretnih točkica (Slika 9). Najniži izražaj MSH2 u bubregu zdravoga štakora bio je u drugom mjesecu života. U osmom je mjesecu života izražaj MSH2 bio 5 puta veći nego u dobi od dva mjeseca. U 14-mjesečnih štakora izražaj MSH2 je kao u dvomjesečnih štakora ($R^2 = 91,35 \%$, $p < 0,0001$, $E \approx 1,63 \times 10^5$ u korist H_a) (Slike 9 i 10a).

Kora i srž imaju različite funkcije i mikrokoliš, s tim da je mikrokoliš srži zahtjevniji zbog hiperosmolarnosti. Dinamika izražaja MSH2 analizirana je u oba odjeljka. Dinamika izražaja MSH2 u kori pokazuje isti obrazac kao u cijelom bubregu. Izražaj MSH2 u srži ima gotovo identični profil onome u kori (Slike 9 i 10b, c). U bubregu dvomjesečnih štakora srž ima 2,8 puta veći izražaj MSH2 nego kora (95 % CI 2 do 4,3 puta, $R^2 = 71,26 \%$, $p = 0,034$, $E = 3,54$ u korist H_a) (Slika 10d). U osmomjesečnih štakora izražaj MSH2 u kori je 1,25 puta veći nego u srži (95 % CI 1,01 do 1,49 puta, $R^2 = 30,86 \%$, $p = 0,039$, $E = 2,53$ u korist H_a). U 14-mjesečnih je štakora MSH2 više izražen u kori nego u srži, ali razlika nije statistički značajna (povećanje = 1,97 puta, 95 % CI 0,72 do 3,22, $R^2 = 53,86 \%$, $p = 0,096$, $E = 14,58$ u korist H_0) (Slika 10d).



Slika 9. Izražaj MSH2 u kori i srži u analiziranim vremenskim točkama u zdravih štakora i štakora sa šećernom bolešti tipa 1 (povećanje 200 x). Legenda: g sa strelicom – glomerul, t sa strelicom –

kanalić, vrh strelice – pozitivan fluorescentni signal za MSH2. Mjerica (engl. *scale bar*) je 200 μm .



Slika 10. Normalizirane razine izražaja MSH2 u cijelom bubregu (a), kori (b) i srži (c) zajedno s izravnom usporedbom izražaja srži i kore u kontrolnoj (d) i dijabetičnoj skupini (e). Posljednji grafik (f) predstavlja izražaj MSH2 kod dijabetičnih i zdravih štakora (C) bez obzira na dob i dio tkiva. U svakom grafikonu izražaj je normaliziran na razinu skupine štakora od 2 mjeseca. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. Štakori u skupini šećerne bolesti tipa 1 bili su dijabetičari 6 mjeseci u slučaju skupine od 8 mjeseci, odnosno 12 mjeseci dijabetičari u slučaju skupine od 14 mjeseci.

4.2 Dinamika izražaja MSH2 u bubregu štakora sa šećernom bolesti tipa 1 tijekom starenja

Dinamika izražaja MSH2 u bubrezima pokusnih štakora starih između osam i 14 mjeseci slijedi silazni trend sličan trendu u kontrolnoj skupini. Izražaj MSH2 u bubregu 14-mjesečnih pokusnih štakora 1,63 puta niži je nego u osmomjesečnih pokusnih štakora (95 % CI 1,25 do 1,99 puta, $R^2 = 58,14\%$, $p = 0,003$, $E = 30,89$ u korist H_a) (Slike 9 i 10a). MSH2 izražaj u kori, odnosno u srži slijedi isti obrazac kao u cijelom bubregu pokusnoga štakora (Slika 10b, c). U pokusnih osmomjesečnih štakora, MSH2 je 1,73 puta više izražen u kori, nego u srži (95 % CI 1,36 do 2,1, $R^2 = 66,61\%$, $p = 0,001$, $E = 115,3$ u korist H_a). U 14-mjesečnih pokusnih štakora izražaj MSH2 1,46 puta veći je u kori nego u srži (95 % CI 0,98 do 2 puta, $R^2 = 31,73\%$, $p = 0,056$, $E = 1,58$ u korist H_a) (Slike 9 i 10e).

Kad je izražaj MSH2 u bubregu pokusnih štakora uspoređen sa zdravom kontrolom, nije nađena značajna razlika u 8. mjesecu života (11 puta, 95 % CI 0,88 do 1,33, $R^2 = 9,86\%$, $p = 0,296$, $E = 2,88$ u korist H_0) (Slika 10a). Međutim, u 14. mjesecu života izražaj MSH2 u bubregu pokusnih štakora u usporedbi s kontrolom bio je 2,01 puta veći (95 % CI 1,15 do 2,87 puta, $R^2 = 52,79\%$, $p = 0,026$, $E = 2,659$ u korist H_a) (Slika 10a). Nije nađena značajna razlika u izražaju MSH2 u kori pokusnih štakora starih osam i četrnaest mjeseci (Slika 10b). U 8-mjesečnih štakora izražaj je MSH2 u srži manji nego u kontroli za 1,38 puta (95 % CI 1,16 do 1,6 puta, $R^2 = 56,86\%$, $p = 0,002$, $E = 41,75$ u korist H_a), a s 14 mjeseci života veći za 2,29 puta (95 % CI 1,46 do 3,12 puta, $R^2 = 66,08\%$, $p = 0,007$, $E = 11,77$ u korist H_a) (Slika 10c).

Analiza povezanosti životne dobi, šećerne bolesti tipa 1 i tkivnoga odjeljaka s izražajem MSH2 urađena je trosmjernim ANOVA testom (Tablica 1). Prema rezultatima, dob objašnjava 57 % razlike u izražaju MSH2 i tkivni odjeljak 14 %. Šećerna bolest tipa 1 po sebi nije povezana s izražajem MSH2 (Slika 10f). Međutim, interakcija dobi i šećerne bolesti tipa 1 objašnjava 7 % promatranih razlika (Slika 10 a – c).

Tablica 1. Učinak dobi, šećerne bolesti tipa 1 i tkivnoga odjeljka na izražaj MSH2.

<i>Čimbenik</i>	<i>% u kojem se objašnjava razlika*</i>	<i>p vrijednost*</i>
Dob	57,07	<0,001
šećerna bolest tipa 1	0,7612	0,251
tkivni odjeljak	13,91	<0,001
<i>Međudjelovanja</i>		
dob i šećerna bolest tipa 1	6,581	0,001
dob i tkivni odjeljak	1,193	0,153
šećerna bolest i tkivni odjeljak	0,9100	0,210
dob, šećerna bolest i tkivni odjeljak	0,5807	0,315

*trosmjerna ANOVA

4.3 Izražaj MSH2 u humanome karcinomu bubrega

Prema iznesenim rezultatima na štakorskom modelu, izražaj MSH2 u bubregu značajno je manji u starijih štakora. S obzirom da je upravo starija životna dob u ljudi jedan od glavnih čimbenika rizika, iz javno dostupnih transkriptomskih baza (engl. *mRNA seq.*) analiziran je izražaj mRNA *MSH2* u karcinomu bubrega. Prema našoj analizi, karcinom bubrega ima 5 % veći medijan izražaja *MSH2* mRNA od zdravoga bubrežnog tkiva ($R^2 = 64,7 \%$, $p < 0,001$, $E = 54,13$ u korist Ha) (slika 11a). Medijan izražaja mRNA *MSH2* značajno je veći u papilarnome karcinomu, nego u svijetlostaničnome karcinomu i kromofobnome karcinomu ($R^2 = 97,27 \%$, $p < 0,001$, $E > 100$ u korist Ha) (slika 11b).

S obzirom da je stanična proliferacija jedan od čimbenika koji povećava izražaj mRNA *MSH2*, modeliran je odnos u zdravome i tumorskome tkivu (Slike 11d, e). Izražaj mRNA *MSH2*, normaliziran prema izražaju mRNA *Ki-67*, bio je najveći u zdravome bubrežnom tkivu, manji u papilarnome karcinomu i svijetlostaničnome karcinomu te najmanji u kromofobnome karcinomu, što pokazuje silazni trend ($R^2 = 1 \%$, $p = 0,011$, $E = 7.37$ u korist Ha). Rezultat upućuje da su karcinomi bubrega, s obzirom na stopu proliferacije, MSH2 deficijentni.

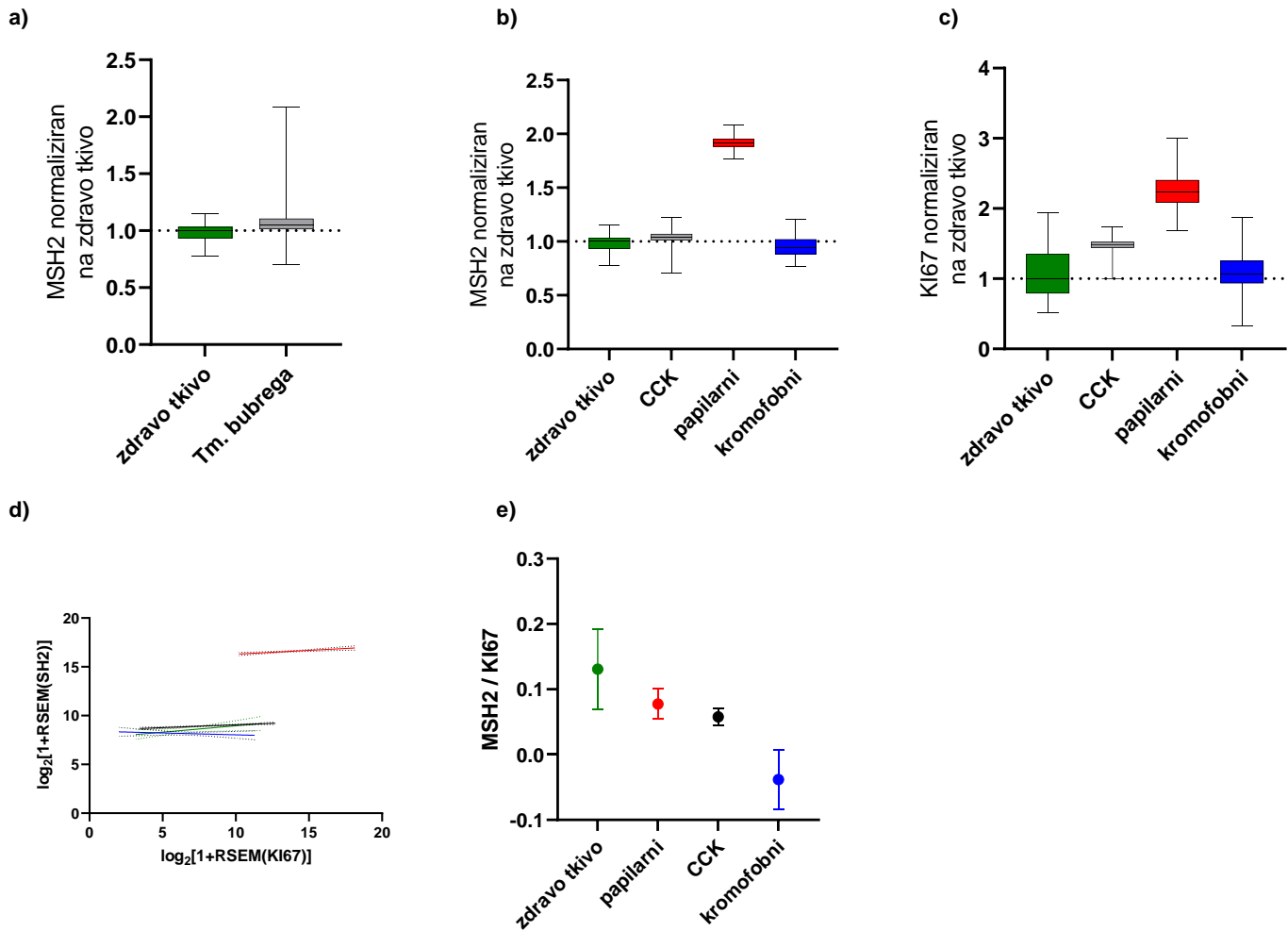
Izražaj mRNA *MSH2* u analiziranim tipovima karcinoma bubrega uspoređen je po stadiju bolesti. U svijetlostaničnome karcinomu izražaj se mRNA *MSH2* između različitih stadija bolesti

razlikuje za manje od 1 % ($R^2 = 0,7 \%$, $p = 0,2$, $E = 2.1$ u korist H_0) (slika 12a). S druge strane, izražaj mRNA *Ki-67* linearno se povećava za 2 % sa svakim višim stadijem bolesti ($R^2 = 2 \%$, $p = 0,004$, $E > 100$ u korist H_a) (slika 12b). Kad se normalizira na proliferaciju, odnosno izražaj mRNA *Ki-67*, izražaj mRNA *MSH2* linearno opada od nižeg prema višim stadijima bolesti ($R^2 \approx 0\%$, $p = 0,498$, $E = 2,168$ u korist H_0) (slika 12c).

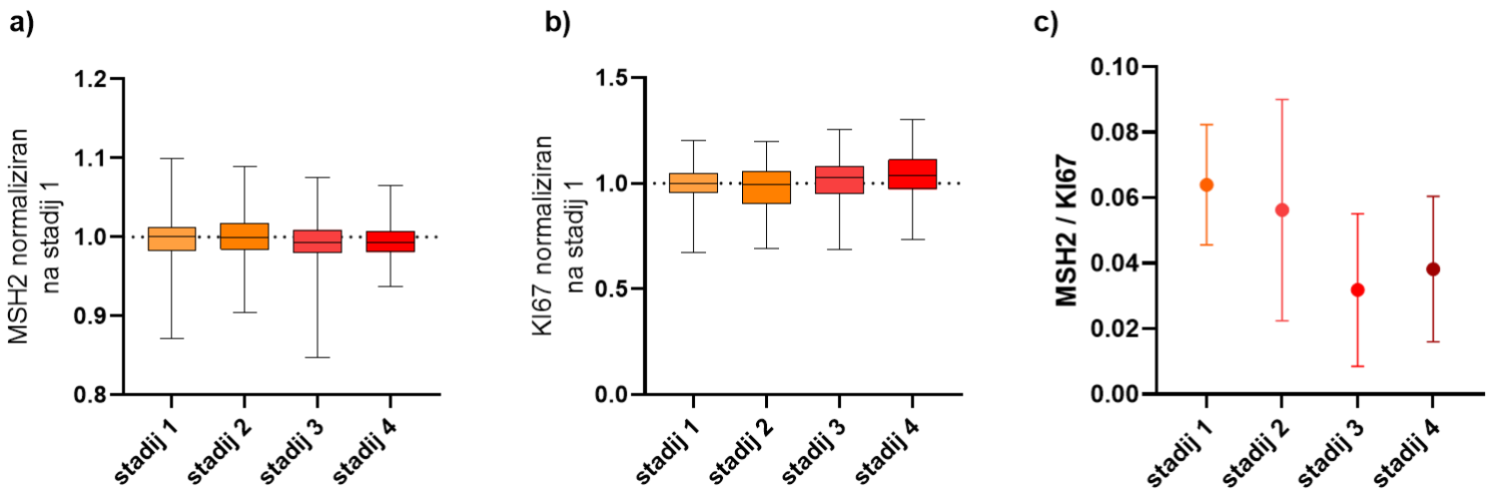
U svijetlostaničnome karcinomu izražaj mRNA *MSH2* smanjuje se kako raste nuklearni gradus po Fuhrmanovoj ($R^2 = 0,9\%$, $p = 0,016$, $E \approx 7$ u korist H_a , slika 13a), a izražaj mRNA *Ki-67* raste za 5 % ($R^2 = 2,9\%$, $p < 0,001$, $E > 100$ u korist H_a) (slika 13b). Ako se izražaj mRNA *MSH2* normalizira na proliferaciju, odnosno izražaj mRNA *Ki-67*, ne nalazi se razlika ($R^2 \approx 0.2\%$, $p = 0,388$, $E = 7.034$ u korist H_0) (slika 13c, d)

U papilarnome karcinomu bubrega izražaj se mRNA *MSH2* značajno ne razlikuje po stadijima bolesti ($R^2 = 2,3 \%$, $p = 0,074$, $E = 1.5$ u korist H_a) (slika 14a), a izražaj mRNA *Ki-67* veći je u višim stadijima bolesti ($R^2 = 12,3 \%$, $p < 0,001$, $E > 100$ u korist H_a) (slika 14b). Izražaj mRNA *MSH2* normaliziran na proliferaciju, odnosno izražaj mRNA *Ki-67*, najmanji je u prvom stadiju ($R^2 = 0,2 \%$, $p = 0,541$, $E = 6,99$ u korist H_0) (slika 14c).

U kromofobnome karcinomu izražaj mRNA *MSH2* prati parabolični trend i najmanji je u drugom i trećem stadiju ($R^2 = 9,8 \%$, $p = 0,030$, $E = 3.81$ u korist H_a) (slika 15a). Najveći je izražaj mRNA *Ki-67* u karcinomu bolesnika u četvrtom stadiju bolesti ($R^2 = 13,17 \%$, $p = 0,007$, $E = 5,99$ u korist H_a) (slika 15b). U prva tri stadija bolesti izražaj mRNA *MSH2* značajno je negativno povezan s izražajem mRNA *Ki-67*, a u četvrtom stadiju bolesti povezanost je pozitivna ($R^2 = 2,8 \%$, $p = 0,011$, $E = 2,03$ u korist H_a) (slika 15c).

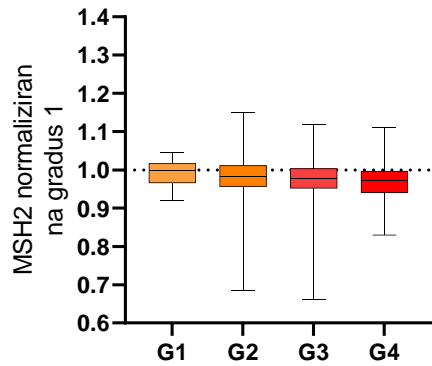


Slika 11. a) Dijagram okvira s ručicama koji prikazuje izražaj MSH2 mRNA u tumorskom tkivu ($n = 870$) u odnosu na zdravo tkivo ($n = 27$). b) Izražaj MSH2 u svijetlostaničnom (CCK, $n = 603$), papilarnom ($n = 176$) i kromofobnom ($n = 91$) karcinomu bubrega. c) Izražaj KI67 u histološkim tipovima tumora. d) Modeliranje odnosa mRNA MSH2 i KI67. e) Nagibi pravca iz modela s prethodne slike, tj. izražaj MSH2 normaliziran na izražaj KI67 u zdravom tkivu i tri histološka tipa karcinoma bubrega.

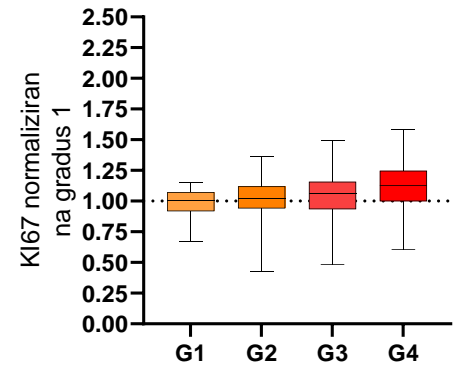


Slika 12. a) Dijagram okvira s ručicama koji prikazuje izražaj MSH2 u stadijima svjetlostaničnoga karcinoma (stadij 1, n = 294; stadij 2, n = 68; stadij 3, n = 139; stadij 4 n = 102). b) Izražaj KI67 po stadijima. c) Normaliziran izražaj MSH2 na MKI67 po stadijima svjetlostaničnoga karcinoma.

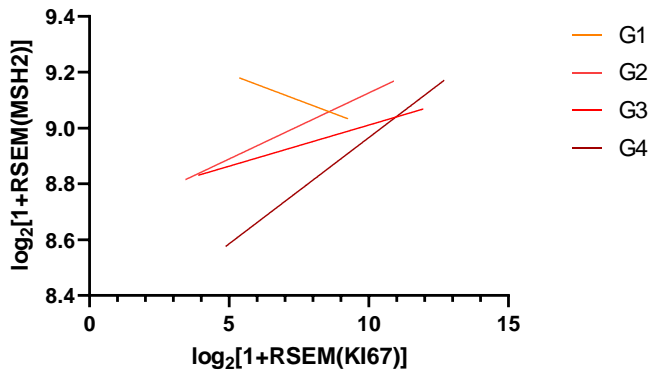
a)



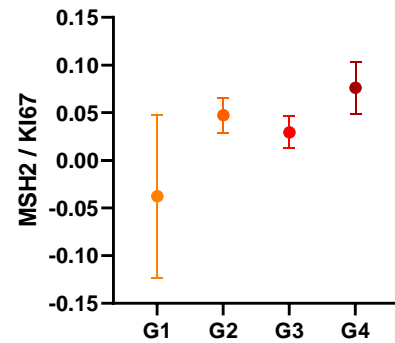
b)



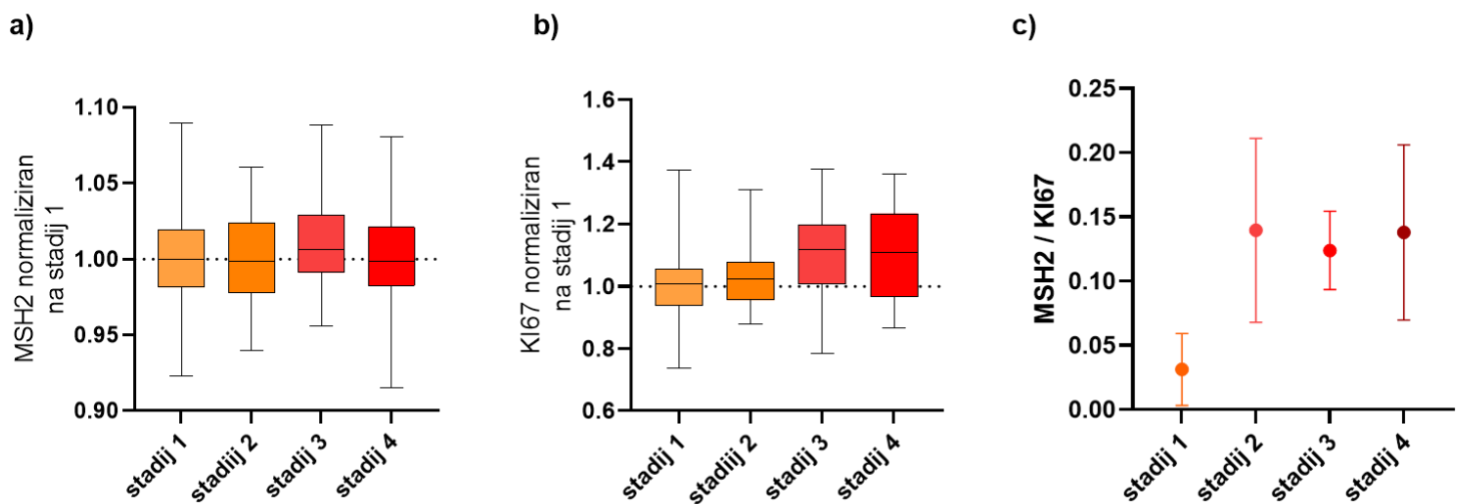
c)



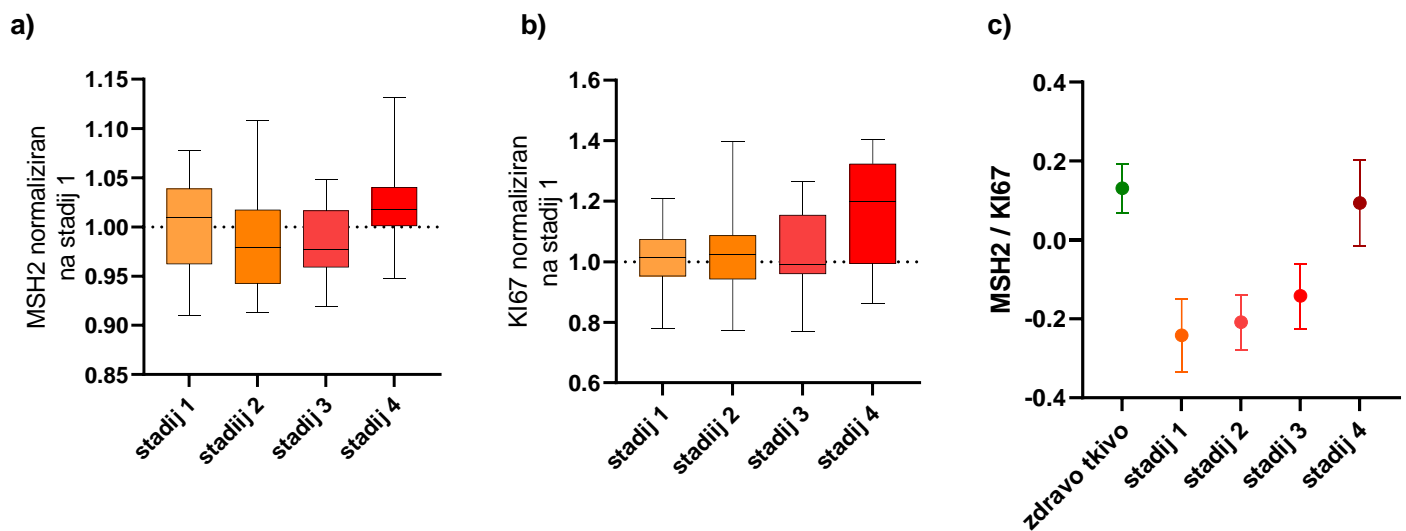
d)



Slika 13. a) Dijagram okvira s ručicama koji prikazuje izražaj MSH2 normaliziran na zdravo tkivo po Furhamovu nuklearnom gradusu u svijetlostaničnome karcinomu bubrega (G1, n = 15; G2, n = 257; G3, n = 235; G4, n = 91). b) Izražaj KI67 po nuklearnome gradusu. c) Modeliranje odnosa MSH2 i KI67, te (d) nagib pravca, odnosno normalizirani izražaj MSH2 na KI67 u različitim gradusima.



Slika 14. a) Dijagram okvira s ručicama koji prikazuje izražaj MSH2 u stadijima papilarnoga karcinoma (stadij 1, n = 187; stadij 2, n = 23; stadij 3, n = 63; stadij 4 n = 19). b) Izražaj KI67 po stadijima. c) Normaliziran izražaj MSH2 na KI67 po stadijima papilarnoga karcinoma.



Slika 15. a) Dijagram okvira s ručicama koji prikazuje izražaj MSH2 u stadijima kromofobnoga karcinoma (stadij 1, n = 29; stadij 2, n = 33; stadij 3, n = 17; stadij 4 n = 10). b) Izražaj KI67 po stadijima. c) Normaliziran izražaj MSH2 na KI67 po stadijima kromofobnoga karcinoma.

5 RASPRAVA

5.1 Izražaj MSH2 proteina s obzirom na starenje i tkivni odjeljak

U zdravih štakora dinamika izražaja MSH2 proteina ima parabolični trend, s vrhuncem izražaja u osmome mjesecu. Taj se trend može objasniti dinamikom lučenja hormona, tj. normalnim obrascem rasta jedinke (55).

Hormonalne promjene koje se događaju za vrijeme puberteta i njihova stabilizacija i smanjeno lučenje u odraslo doba utječu na izražaj MSH2 proteina. Pubertet u štakora počinje u drugom mjesecu života i završava oko osmog mjeseca života, kada nastupa odraslo doba. Za vrijeme puberteta štakorski se bubreg poveća za 40 % zbog hipertrofije i proliferacije stanica (56). Rast bubrega najvećim je dijelom potaknut hormonom rasta te endokrinim i parakrinim čimbenicima rasta, od kojih inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-1) igra ključnu ulogu (57). Hormon rasta i stanična proliferacija povećavaju izražaj MSH2 proteina (11 – 13, 15). Starenjem dolazi do smanjenoga lučenja hormona rasta, a oksidacijski se stres povećava zbog stvaranja sve više slobodnih radikala. Kumulacija navedenih promjena dovodi do smanjenog izražaja MSH2 u štakora starih 14 mjeseci (56, 58, 59).

Razlika između kore i srži u izražaju MSH2 tijekom starenja posljedica je različitih patofizioloških interakcija. U odraslih štakora starih 8 mjeseci nađen je manji izražaj MSH2 u srži nego u kori, moguće zbog degradacije MSH2 proteina u hipoksičnome miljeu srži (52, 60). U skladu s tim objašnjenjem, u štakora od 2 mjeseca veći je izražaj MSH2 u srži nego kori jer zbog nezrelosti bubrega srž u mladunaca nije toliko hiperosmolarna i hipoksična.

5.2 Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 na izražaj MSH2 proteina

Utjecaj šećerne bolesti tipa 1 na izražaj MSH2 u štakorskome bubregu ovisi o trajanju bolesti, životnoj dobi i bubrežnome odjeljku. Usporedbom izražaja MSH2 u kori 8 mjeseci staroga štakora koji ima šećernu bolest 6 mjeseci sa zdravom kontrolom iste dobi, nismo našli značajne razlike. Bubrežna kora do 8. mjeseca života inicijalno prolazi proces hipertrofije i hiperplazije, a s druge strane, šećerna bolest koja traje 6 mjeseci izaziva oštećenje bubrežnoga tkiva zbog metaboličkoga i hipoksičnoga stresa (61, 62). Pretpostavljamo da u pokusnih štakora pozitivni utjecaj hormona rasta, endokrinih i parakrinih stimulirajućih čimbenika na proizvodnju MSH2 kompenzira povećano oštećenje stanica, nastalo zbog rastućega oksidacijskog stresa i razgradnje MSH2. Stoga je izražaj MSH2 sličan onome u zdravih štakora (55). Međutim, u štakora starih 14 mjeseci, u kojih je šećerna bolest tipa 1 trajala 12 mjeseci, izražaj MSH2 značajno je veći u pokusnih štakora nego u kontroli. Stanični stresni odgovor, započet šećernom bolesti tipa 1 i dugotrajnim oksidacijskim stresom u starijoj životnoj dobi koja je bez jačeg djelovanja stimulirajućih čimbenika rasta i hormona, ima za posljedicu veći izražaj MSH-2 nego u zdravoj kontroli iste dobi (63).

Smanjeni izražaj MSH2 u bubrežnoj srži 8-mjesečnih štakora sa šećernom bolesti tipa 1 u odnosu na zdravu kontrolu može se dvojako objasniti. Transkripcija i translacija *MSH2* gena u stanicama bubrežne srži manja je, a razgradnja MSH2 veća u zahtjevnome hipertoničnom i hipoksičnom mikrokolišu kojeg je šećerna bolest tipa 1 još pogoršala. Epitelne stanice Henleove petlje imaju receptor za čimbenik rasta IGF-1 koji prima poticajne čimbenike za proliferaciju. U šećernoj bolesti tipa 1 smanjena je razina IGF-1 i njegova receptora u bubregu i time njihov parakrini/autokrini stimulatívni učinak na rast bubrega (57, 64). Osim toga, tkivo bubrega u štakora stari bez skraćivanja telomera, a to je poticaj u drugim vrstama za povećanje izražaja MSH2 (56).

5.3 Izražaj MSH2 na transkripcijskoj razini u humanome karcinomu bubrega

Kad se uspoređi izražaj mRNA *MSH2* normaliziran na biljeg proliferacije mRNA *Ki-67*, u najčešćim tipovima karcinoma bubrega, kromofobni karcinom pokazuje najmanji izražaj, dapače izgleda da proliferacija smanjuje izražaj mRNA *MSH2*. U papilarnome karcinomu i svjetlostaničnome karcinomu izražaj mRNA *MSH2* i mRNA *Ki-67* proporcionalni su, ali u manjoj mjeri nego u normalnome tkivu bubrega. To upućuje da su karcinomi bubrega relativno MSH2 deficijenti s obzirom na stopu proliferacije.

Relativna MSH2 deficijencija karcinoma bubrega može biti zanimljiva u kontekstu imunologije/imunoterapije tumora. U praksi se pokazalo da je MSH2 deficijencija tumora povoljan čimbenik u odgovoru na imunoterapiju blokatorima imunološke kontrolne točke, bez obzira na sijelo i histologiju raka (65). U određivanju relativne MSH2 deficijencije karcinoma bubrega, trebalo bi svakako uključiti: I) normalizaciju MSH2 izražaja na oksidacijski status stanice, II) modelirati odnos relativne MSH2 deficijencije i supresivnih dijelova imunološkoga odgovora (izražaja molekula imunološke kontrolne točke, biljega T regulacijskih limfocita ili putova imunosupresivnih limfocita) i III) analizirati odnos normaliziranog MSH2 izražaja s mitotskim indeksom. Takvi modeli možda bi odgovorili na pitanje može li se imunoterapija učinkovito primijeniti u liječenju karcinoma bubrega u kojih je izražaj MSH2 (normaliziran na proliferaciju i oksidacijski status) manji nego u normalnome tkivu, odnosno koji su relativno MSH2 deficijenti.

5.4 Implikacije i translacijska vrijednosti istraživanja

Nalaz od najveće translacijske vrijednosti u ovom istraživanju jest da se u bubregu štakora izražaj MSH2 značajno smanjuje starenjem. U ljudi starija životna dob jedan je od čimbenika rizika za karcinom bubrega. Smanjena aktivnost MSH2 može biti čimbenik uključen u kancerogenezu jer je MSH2 protein aktivan u kontrolnim točkama staničnog ciklusa. Zaustavljanje staničnoga ciklusa na kontrolnim točkama u G1, S ili G2 fazi nastaje kad se senzorni proteini vežu na oštećenu/nerepliciranu DNA. Aktiviraju se protein kinaze ATM i ATR, fosforiliraju Chk1 i Chk2 i zaustavljaju stanični ciklus, što ponekad rezultira apoptozom. MSH2 igra važnu ulogu u funkcioniranju svih kontrolnih točaka popravka oštećenja DNA prije početka sljedeće faze staničnoga ciklusa pa je razina MSH2 varijabilna i ovisna o fazi staničnoga ciklusa. Ako MSH2

nedostaje ili je nefunkcionalan, povećana je vjerojatnost prenošenja mutacije u sljedeće faze staničnoga ciklusa. Smanjeni izražaj MSH2 dovodi do smanjene aktivacije transkripcijskoga čimbenika p53 i omogućuje odvijanje staničnoga ciklusa bez prethodnoga popravka oštećene DNA u G1 fazi.

U skupini 14-mjesečnih štakora sa šećernom bolesti tipa 1 izražaj MSH2 bio je značajno veći nego u kontrolnoj skupini iste dobi. To implicira da šećerna bolest tipa 1 nije čimbenik rizika za karcinom bubrega, što je sukladno epidemiološkim podacima koji nisu prepoznali šećernu bolest tipa 1 kao neovisni čimbenik rizika za karcinom bubrega (66, 67).

5.5 Ograničenja i nedostaci istraživanja

Studija bi dala više informacija da je u imunohistokemijsku analizu bubrežnoga tkiva pokusnih i kontrolnih štakora uključila biljege oksidativnoga stresa (glutation peroksidaze, OGG1 i 8-oxo-dG), parakrinih čimbenika rasta i njihovih receptora (IGF – 1 i IGF α -1) i biljega proliferacije (Ki-67). Osim toga, u daljnjem istraživanju rezultate bi trebalo potvrditi drugim metodama, kao što su rt-PCR i Western blot. S obzirom da je ženski spol zaštitni čimbenik u šećernoj bolesti, trebalo bi ispitati utjecaj spola na izražaj MSH2 (68, 69). Transkriptomski dio istraživanja može se ubuduće poboljšati tako da se, umjesto pojedinačnih gena, analizira izražaj skupova gena (engl. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) koji su uključeni u proliferaciju, odgovor stanice na oksidacijski stres i popravak pogrešno sparenih baza.

6 ZAKLJUČAK

1. Izražaj MSH2 u kontrolnoga i pokusnoga štakora slijedi paraboličnu dinamiku s vrhuncem izražaja u osmome mjesecu života.
2. U 14-mjesečnoga pokusnog štakora izražaj je MSH2 u bubregu za 30 % veći nego u kontrolnoga zdravog štakora.
3. Dob utječe na izražaj MSH2 više nego šećerna bolest, štoviše učinak šećerne bolesti ovisan je o dobi.
4. Karcinom bubrega ima oko 5 % manje mRNA *MSH2* nego zdravi bubreg te je MSH2 relativno deficijentan. U kromofobnome karcinomu izražaj MSH2 i Ki-67 obrnuto je proporcionalan.

7 SAŽETAK

Uvod: Homeostaza proliferirajućih tkiva ovisi o cjelovitoj DNA molekuli. *MSH2* (MutS homolog 2) pripada sustavu gena popravljача pogrešno sparenih baza i aktivan je u više faza staničnoga ciklusa. Neki tumori i neneoplastične bolesti povezane su s ugašenom ili smanjenom aktivnošću *MSH2*. Na animalnome modelu štakora analiziran je utjecaj starenja i šećerne bolesti tipa 1 na imunohistokemijski izražaj *MSH2* u bubregu, a iz humane transkriptomске javno dostupne baze izražaj mRNA *MSH2* u karcinomu bubrega.

Tvoriva i postupci: U kohorti je 25 štakora podijeljenih u kontrolnu skupinu i u pokusnu skupinu kojoj je u drugom mjesecu života streptozocinom inducirana šećerna bolest tipa 1. Životinje su žrtvovane u dobi od dva, osam, odnosno 14 mjeseci i oformljeno je pet skupina: zdravi štakori stari 2 mj., stari 8 mj. i stari 14. mj., te štakori sa šećernom bolesti tipa 1 stari 8 mj. i stari 14. mj. Preparati bubrežnoga tkiva obojeni su protutijelom na *MSH2* indirektnom imunofluorescentnom metodom, mikroskopski analizirani, fotografirani i izražaj *MSH2* kvantificiran u ImageJ računalnome programu. Transkriptomска analiza izražaja mRNA *MSH2* u humanome karcinomu bubrega učinjena je iz javno dostupnih baza podataka s mrežne usluge Xena.

Rezultati: Dob je glavni čimbenik koji utječe na izražaj *MSH2* u tkivu bubrega štakora. Učinak dobi na *MSH2* prati paraboličnu dinamiku s vrhuncem izražaja u dobi od 8 mjeseci, dok su razine u dobi od 2 i 14 mjeseci slične ($p < 0,001$). U štakora sa šećernom bolesti tipa 1 starih 14 mjeseci značajno je veći izražaj *MSH2* nego u zdravih kontrola iste dobi ($p = 0,026$). Kad se izražaj *MSH2* na mRNA razini u uzorcima humanog karcinoma normalizira na stopu proliferacije izraženu s mRNA *Ki-67*, niži je u karcinomu nego u zdravom tkivu ($p = 0,011$).

Zaključak: Starija životna dob smanjuje izražaj *MSH2* u bubregu, a šećerna bolest povećava. Utvrđen je relativni manjak mRNA *MSH2* u karcinomu bubrega u odnosu na zdravo tkivo što upućuje na relativnu *MSH2* deficijenciju.

8 SUMMARY

Title: Influence of Age and Diabetes Mellitus Type 1 on MSH2 (MutS homolog 2) Expression in a Rat Kidney Tissue.

Background: Introduction: Homeostasis of proliferating tissues depends on the complete DNA molecule. MSH2 (MutS homolog 2) belongs to the base mismatch repair gene system and is active in several phases of the cell cycle. Some tumors and non-neoplastic diseases are associated with suppressed or reduced MSH2 activity. The influence of aging and type I diabetes on the immunohistochemical expression of MSH2 in the kidney was analyzed using a rat animal model, and MSH2 mRNA expression in kidney cancer from the publicly available human transcriptome database.

Methods: To study the influence of age, three groups of healthy rats were formed: 2 months, 8 months and 14 months old. Two groups of diabetic rats were formed: 8 months old and 14 months old. 8-month-old diabetic rats were diabetic for 6 months, similarly 14-month-old diabetic rats were diabetic for 12 months. The expression of MSH2 in the kidney was studied by quantification of immunofluorescence staining. Transcriptomic analysis of MSH2 expression in human renal carcinoma was performed on a publicly available dataset from the Xena platform.

Results: Age was identified as a major factor affecting MSH2 expression in the kidney. The effect of age followed a parabolic dynamic, with peak expression at 8 months of age and similar levels at 2 and 14 months of age ($p < 0.001$). Diabetes had an age-dependent effect, as evidenced by an increase in MSH2 expression in 14-month-old diabetic rats compared to healthy animals ($p = 0.026$). In an analysis of MSH2 in human kidney cancer from publicly available datasets, MSH2 mRNA normalized to Ki-67 mRNA proliferation rate appears to be lower in cancer than in healthy tissue ($p = 0.011$).

Conclusions: Age affects MSH2 expression in kidneys more than diabetes mellitus. Since aging is a risk factor for renal neoplasia, the reduction of MSH2 in aged rats could represent one of the pro-oncogenic mechanisms of aging.

9 LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J. Mokraćni sustav. U: Junqueira LC, Carneiro J, editors. Osnove histologije - udžbenik i atlas. 10. izdanje Zagreb: Školska knjiga;2005.
2. Zajicek G. Streaming organism. *Med Hypotheses*. 1995;45:403-7.
3. Zajicek G, Arber N. Streaming kidney. *Cell Prolif*. 1991;24:375-82.
4. Bollain-Y-Goytia J, Meza-Lamas E, Lopez A, Avalos-Diaz E, Rodriguez-Padilla C, Herrera-Esparza R. Renal cell turnover results in a fine balance between apoptosis and cell proliferation. *JBRT*. 2006;6:131-8.
5. Cooper GM, Hausmann RE. Stanica, molekularni pristup. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada;2010.
6. Sinclair J. DNA, RNA, proteini. U: Cox TM, Sinclair John, urednik. Molekularna biologija u medicini. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada;2000.
7. Conde-Pérezprina JC, León-Galván MÁ, Konigsberg M. DNA mismatch repair system: Repercussions in cellular homeostasis and relationship with aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.*;2012:728430
8. Pino MS, Chung DC. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5:385-99.
9. Piao J, Nakatsu Y, Ohno M, ichi Taguchi K, Tsuzuki T. Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci*. 2013;10:73-9.
10. Christmann M, Kaina B. Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. *J. Biol. Chem*. 2000;275:36256-62.
11. Tennen RI, Haye JE, Wijayatilake HD, Arlow T, Ponzio D, Gammie AE. Cell-cycle and DNA damage regulation of the DNA mismatch repair protein Msh2 occurs at the transcriptional and post-transcriptional level. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12:97-109.
12. Franchitto A, Pichierri P, Piergentili R, Crescenzi M, Bignami M, Palitti F. The mammalian mismatch repair protein MSH2 is required for correct MRE11 and RAD51 relocalization

- and for efficient cell cycle arrest induced by ionizing radiation in G2 phase. *Oncogene*. 2003;22:2110-20.
13. Martin SA, McCarthy A, Barber LJ, Burgess DJ, Parry S, Lord CJ, i sur. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO Mol Med*. 2009;1:323-37.
 14. Fishel R, Wilson T. MutS homologs in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7:105-13.
 15. Iwanaga R, Komori H, Ohtani K. Differential regulation of expression of the mammalian DNA repair genes by growth stimulation. *Oncogene*. 2004;23:8581-90.
 16. Hoda Badr Cindy L, Carmack DAKMC, Revenson TA. Cell-cycle and DNA damage regulation of the DNA mismatch repair protein Msh2 occurs at the transcriptional and post-transcriptional level. *Bone*. 2011;23:1-7.
 17. Canecki- Varžić S, Rahelić D, Mihić D, Bilić- Čurčić I. Šećerna bolest i drugi metabolički poremećaji. U: Mihić D, Mirat J, Včev A, urednici. *Interna medicina*. 1. izdanje. Osijek: Medicinski fakultet Osijek;2021.
 18. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*. 2005;4:1-11.
 19. Silbernagl S, Lang F. Necrotic cell death. U: *Color atlas of pathophysiology*. Stuttgart: Thieme; 2016. str. 12–3.
 20. Rumora L, Petrik J, Žanić Grubišić T. Oksidacijski stres i stanična smrt. *Biochem Med. Biochemia Medica*, 13 2003;13(3-4):75–82.
 21. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Oxidative phosphorylation. U: *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman & Co.; 2007. str. 517–9.
 22. Pruteanu LL, Bailey DS, Grădinaru AC, Jäntschi L. The biochemistry and effectiveness of antioxidants in food, fruits, and marine algae. *Antioxidants*. 2023 Apr 2;12(4):860
 23. Guthrie RA, Guthrie DW. Pathophysiology of diabetes mellitus. *Crit Care Nurs Q*. 2004;27:113-25.

24. Robertson AP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.*. 2004;279:42351-4.
25. Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab.* 2014;20:967-77.
26. Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 2000 May 12;86(9).
27. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;9: 656-62.
28. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. *BioFactors.* 1999 1;157-67.
29. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature.* 1997;388:548-54.
30. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1994;16:383-91.
31. Melov S. Mitochondrial Oxidative Stress: Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:219-25.
32. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30:42-59.
33. Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, et al. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283:148-54.
34. Yoo KH, Won KY, Lim SJ, Park YK, Chang SG. Deficiency of MSH2 expression is associated with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;8:2135-9.

35. Kostic S, Hauke T, Ghahramani N, Filipovic N, Vukojevic K. Expression pattern of apoptosis-inducing factor in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Histochem.* 2020;122:151655
36. Dragun M, Filipović N, Racetin A, Kostić S, Vukojević K. immunohistochemical expression pattern of mismatch repair genes in the short-term streptozotocin-induced diabetic rat kidneys. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021;29:83-91.
37. Guo G, Gui Y, Gao S, Tang A, Hu X, Huang Y, i sur. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2011;44:17-9.
38. Durinck S, Stawiski EW, Pavía-Jiménez A, Modrusan Z, Kapur P, Jaiswal BS, i sur. Spectrum of diverse genomic alterations define non-clear cell renal carcinoma subtypes. *Nat Genet.* 2015;47:13-21.
39. Campbell MR, Wang Y, Andrew SE, Liu Y. Msh2 deficiency leads to chromosomal abnormalities, centrosome amplification, and telomere capping defect. *Oncogene.* 2006;25:2531-6.
40. Martinez P, Siegl-Cachedenier I, Flores JM, Blasco MA. MSH2 deficiency abolishes the anticancer and pro-aging activity of short telomeres. *Aging Cell.* 2009;8:2-17.
41. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, i sur. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet.* 2014;46:225-33.
42. Witham M. Starenje i bolest. U: Ralston S, Penman I, Strachan M, Hobson R, urednici. *Davidsonove osnove interne medicine.* 23. izdanje Zagreb: Medicinska naklada; 2022. str. 1301-12.
43. Silbernagl S, Lang F. Aging and life expectancy. U: *Color Atlas of Pathophysiology.* 2. izdanje. Stuttgart: Thieme; 2009. str.20-3.
44. Poudel SB, Dixit M, Neginskaya M, Nagaraj K, Pavlov E, Werner H, i sur. Effects of GH/IGF on the aging mitochondria. *Cells.* 2020 Jun 2;9(6):1384.

45. Srivastava LM, Bora PS, Bhatt SD. Diabetogenic action of streptozotocin. *Trends Pharmacol Sci.* 1982;3:376-8.
46. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain.* 1993;53:8-8.
47. Mark S, F.Claire H, Wilson R, Foley P, urednici. *The Laboratory Rat.* 3rd ed. Academic Press; 2019. str. 1180.
48. Kim Suvarna Christopher Layton JB. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.* 8. izdanje Elsevier; 2018. str. 584.
49. Bankhead P. Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ [Internet]. Peter Bankhead;2014. str. 195.
50. Kapushesky M, Adamusiak T, Burdett T, Culhane A, Farne A, Filippov A, i sur. gene expression atlas update- a value-added database of microarray and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res.* 2012;40 (Database issue).
51. Lee CJ, Gardiner BS, Evans RG, Smith DW. A model of oxygen transport in the rat renal medulla. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2018;315:F1787–811.
52. Sands JM, Layton HE. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol.* 2009;29:178-95.
53. Anderson DR. *Quantifying the Evidence About Science Hypotheses. U: model based inference in the life sciences: a primer on evidence.* 1. izdanje New York: Springer Science+Business Media, LLC;2008 str. 83-103
54. Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA statement on p-values: context, process, and purpose. *Am Stat.* 2016;70:129-33.
55. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013;4:624-30.
56. Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, Halloran KM, Grimm P, Schmidt BMW i sur. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* 2003;83:134-43.

57. Feld S, Hirschberg R. Growth hormone , the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev.* 1996;17:423-80.
58. Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J. decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology.* 1980;107:1875-9.
59. Takahashi S, Kawashima S, Seo H, Matsui N. Age-related changes in growth hormone and prolactin messenger rna levels in the rat. *Endocrinol Jpn.* 1990;37:827-40.
60. Mcelroy GS, Chandel NS. Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia. *Exp Cell Res* 2017;356:217-22.
61. Nyengaard JR, Flyvbjerg A, Rasch R. The impact of renal growth, regression and regrowth in experimental diabetes mellitus on number and size of proximal and distal tubular cells in the rat kidney. *Diabetologia.* 1993;36:1126-31.
62. Obineche EN, Mensah-Brown E, Chandranath SI, Ahmed I, Naseer O, Adem A. Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Arch Physiol Biochem.* 2001;109:241-5.
63. Voetseder A, Picard N, Gaspert A, Walch M, Kaissling B, le Hir M. Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294:22-8.
64. Obineche EN, Mensah-Brown E, Chandranath SI, Arafar K, Adem A. Loss of kidney IGF-1 receptors in experimental long-term diabetic rats. *Endocr Res.* 2001;27:293-302.
65. Abraham J, Gulley J. *Bethesda handbook of clinical oncology.* 5. izdanje. Baltimore: LWW;2018.
66. Washio M, Mori M, Khan M, Sakauchi F, Watanabe Y, Ozasa K, i sur. diabetes mellitus and kidney cancer risk: the results of Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk (JACC study). *Int. J. Urol..* 2007;14:393-7.
67. Kabaria R, Klaassen Z, Terris MK. Renal cell carcinoma: links and risks. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016;9:45-52.

68. Inoue M, Inoue K, Akimoto K. Effects of age and sex in the diagnosis of type 2 diabetes using glycated haemoglobin in Japan: the Yuport medical checkup centre study. *PLoS One*. 2012;7:2-5.
69. Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;203:259-69.

10 ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Paško Babić

Datum i mjesto rođenja: 26. 01. 1988., Split

Adresa: A. Stepinca 20, 21000 Split

Telefon: 0981730853

E-mail: paskobabic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

Poslijediplomski doktorski studij Biologija novotvorina	2013. – trenutno
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu	2006. – 2012.
Nadbiskupska klasična gimnazija “Don Frane Bulić”, Split	2002. – 2006.
Osnovna škola Gripe	1995. – 2002.

RADNO ISKUSTVO:

Pripravnički staž za doktore medicine	2012. – 2013.
Dom zdravlja SDŽ-e	2015. – 2016.
KB Dubrava: - specijalizant iz „Opća interna medicina”	2017. – 2022.
- specijalist iz opće interne medicine	2022. – 2022.
SB Agram- Split- specijalist opće interne medicine	2023.g. – trenutno

PUBLIKACIJE

1. **Babić P**, Filipović N, Hamzić LF, Puljak L, Vukojević K, Benzon B. Potential influence of age and diabetes mellitus type I on MSH2 (MutS homolog 2) expression in a rat kidney tissue. *Genes* 2022; 13:1053.

2. Lucijanić M, Bušić N, Bistrovic P, Papić I, Zelenika Margeta M, **Babić P**, Barčan M, Pasarić A, Mustapić M, Piskač Živković N, Ortner Hadžiabdić M, Lucijanić T, Lukšić I, Baršić B. Remdesivir and clinical outcomes in COVID-19 patients. *Liječ Vjesn* 2021; 143: 1-11.

3. Lucijanić M, Bušić N, Bistrović P, Papić I, Zelenika Margeta M, **Babić P**, Barčan M, Pasarić A, Mustapić M, Piskač Živković N, Ortner Hadžiabdić M, Lucijanić T, Lukšić I, Baršić B. Real-life experience with remdesivir for treatment of hospitalized coronavirus disease 2019 patients: matched case - control study from a large tertiary hospital registry. *Croat Med J* 2022; 31:536-43.