

# Izražaj bjelančevine Snail u postnatalnom bubregu DAB1-/- miša

---

**Bulat, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:261639>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Bulat**

**IZRAŽAJ BJELANČEVINE SNAIL U POSTNATALNOM BUBREGU DAB1<sup>-/-</sup> MIŠA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Katarina Vukojević**

**Split, srpanj 2020.**

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Anatomija i histologija bubrega.....	2
1.1.1. Bubrežno tjelešće i filtriranje krvi .....	2
1.1.2. Proksimalni zavijeni kanalić .....	4
1.1.3. Henleova petlja .....	5
1.1.4. Distalni zavijeni kanalić.....	5
1.1.5. Sabirne cjevčice i cijevi .....	6
1.1.6. Jukstaglomerularni aparat .....	6
1.1.7. Intersticij bubrega .....	6
1.2. Embrionalni razvoj bubrega.....	7
1.2.1. Faze razvoja .....	7
1.2.2. Sustav odvodnih kanala .....	7
1.2.3. Nefroni .....	8
1.3. Kongenitalne anomalije mokraćnog sustava.....	8
1.4. Snail i epitelno-mezenhimalna tranzicija .....	9
1.5. Mutacija DAB1 .....	10
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	15
3.1. Etika .....	16
3.2. Uzgajanje Dab1 knock-out miša i prikupljanje uzoraka .....	16
3.3. Imunohistokemija .....	16
3.4. Analiza podataka i statistika .....	17
<b>4. REZULTATI</b> .....	18
<b>5. RASPRAVA</b> .....	23
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	26
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	28
<b>8. SAŽETAK</b> .....	32
<b>9. SUMMARY</b> .....	34
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	36

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Katarini Vukojević i asistenticama Ivoni Kosović i Aniti Muić na stručnoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim prijateljima na nezaboravnim trenucima i druženjima kroz sve ove godine studiranja.*

*Hvala mojim roditeljima i sestri na velikoj podršci, savjetima i razumijevanju.*

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

11P – 11. postnatalni dan

14P – 14. postnatalni dan

ADH – antidiuretski hormon

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol bojanje

EMT – epitelno mezenhimalna tranzicija

IgA – imunoglobulin A

IgG – imunoglobulin G

P25 – 25. postnatalni dan

P5 – 5. postnatalni dan

PBS – fosfatna puferna otopina

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PFA – paraformaldehid

PTHrP – parathormonu sličan peptid (engl. *parathyroid related protein*)

Scm – miš s mutacijom na Dab1 genu (engl. *scrambler*)

TGF- $\beta$  – transformacijski čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)

## **1. UVOD**

## 1.1. Anatomija i histologija bubrega

Svaki bubreg ima konveksnu lateralnu površinu i konkavan medijalni rub, hilus, gdje ulaze živci, ulaze i izlaze krvne i limfne žile te izlazi mokraćovod. Gornji kraj mokraćovoda je proširen i naziva se bubrežna nakapnica te se dijeli u dva ili tri velika bubrežna vrča, od kojih polazi nekoliko malih bubrežnih vrčeva (1).

Bubreg se sastoji od kore izvana i srži iznutra. Bubrežna srž se sastoji od 10 do 18 čunjastih ili piramidnih tvorbi, sržnih piramida, a od osnovice svake piramide u koru prodiru sržni tračci (2).

Osnovna građevna jedinica bubrega je nefron, a ima ih od 1 do 4 milijuna. Nefron čine bubrežno tjelešće, proksimalni zavijeni kanalić, tanki i debeli krak Henleove petlje, distalni zavijeni kanalić te sabirne cjevčice i cijevi (1).

### 1.1.1. Bubrežno tjelešće i filtriranje krvi

Bubrežno tjelešće se sastoji od klupka krvnih kapilara (glomerul) okruženog epitelnom čahurom dvostruke stijenke, glomerularnom (Bowmanovom) čahurom. Unutrašnji ili visceralni list čahure obavija kapilare glomerula, a vanjski (parijetalni) list čini vanjsku granicu bubrežnog tjelešća. Listovi zatvaraju mokraćni (interkapsularni) prostor, u koji se filtrira tekućina (glomerularni filtrat) kroz stijenku kapilara i visceralni list. Svako bubrežno tjelešće ima žilni pol, gdje ulazi dovodna arteriola, a izlazi odvodna arteriola i mokraćni pol, od kojeg polazi proksimalni zavijeni kanalić. Nakon što uđe u bubrežno tjelešće, dovodna arteriola se dijeli na 2 – 5 primarnih ogranaka, a svaki od njih se podijeli na kapilare koje čine bubrežni glomerul.

Parijetalni list Bowmanove čahure se sastoji od jednoslojnog pločastog epitela s bazalnom laminom i tankog sloja retikulinskih vlakana. Na mokraćnom polu epitel se mijenja u jednoslojni kubični ili niski cilindrični koji je karakterističan za proksimalni kanalić (1).

Tijekom embrionalnog razvoja epitel parijetalnog lista je nepromijenjen, dok se unutrašnji list mijenja. Stanice unutrašnjeg epitela, podociti, imaju stanični trup, od kojeg odlazi nekoliko primarnih izdanaka. Svaki od njih ima brojne sekundarne izdanke, nožice, koje obuhvaćaju

kapilare glomerula i na udaljenosti od 25 nm izravno dodiruju bazalnu laminu. Stanični trupovi podocita i njihovi primarni izdanci ne dodiruju bazalnu membranu.

Sekundarni izdanci podocita ulaze jedni među druge omeđujući izdužene prostore široke oko 25 nm, koje se nazivaju filtracijske pukotine. Susjedne izdanke povezuje opna, koja na taj način premošćuje filtracijsku pukotinu (3).

Između fenestriranih endotelnih stanica kapilara glomerula i podocita, koji pokrivaju njihove vanjske površine, nalazi se debela bazalna membrana. To je filtracijska barijera koja odjeljuje mokraćni prostor od krvi u kapilarama. Bazalna membrana nastala je stapanjem bazalnih lamina kapilare i podocita. Elektronskomikroskopski razlikuje se središnji, elektronski gust sloj (*lamina densa*) i sa svake strane elektronski svjetliji sloj (*lamina rara*) koji sadžava fibronektin. *Lamina densa* je mreža kolagena tipa IV i laminina u matriksu građenom od negativno nabijenog heparan-sulfat proteoglikana koji sprječava prolaz kationskih molekula te je tako glomerularna membrana selektivni makromolekularni filter. Čestice promjera većeg od 10 nm teško prolaze kroz bazalnu laminu, dok negativno nabijene bjelančevine molekularne mase veće od albumina prolaze samo oskudno (1,4).

Glomerularni filtrat nastaje kao posljedica razlike između koloidnoosmotskog tlaka plazme (20mm Hg) i hidrostatskog tlaka tekućine u Bowmanovoj čahuri (10 mm Hg). Njegov kemijski sastav sličan je sastavu krvne plazme, ali budući da makromolekule teško prolaze kroz glomerularni filter, gotovo uopće ne sadrži bjelančevine.

Mezangijske stanice prijanjaju uz stijenke endotelnih stanica i imaju sposobnost kontrakcije te sadržavaju receptore za natriuretski čimbenik kojeg stvaraju srčane mišićne stanice. Natriuretski čimbenik je vazodilatator koji relaksira mezangijske stanice povećavajući protok krvi i djelotvornu površinu raspoloživu za filtriranje. Osim što imaju sposobnost kontrakcije, mezangijske stanice imaju još funkcija: daju glomerularnu strukturnu potporu, sintetiziraju međustaničnu tvar, vrše endocitozu i uklanjaju molekule koje su se zadržale unutar glomerularne bazalne membrane. Na žilnom polu, izvan glomerula, nalaze se ekstraglomerularne mezangijske stanice koje su dio jukstaglomerularnog aparata (1,3).



### 1.1.2. Proksimalni zavijeni kanalić

Na mokraćnom polu bubrežnog tjelešca pločasti epitel parijetalnog lista Bowmanove čahure prelazi u kubični ili niski cilindrični epitel proksimalnog zavijenog kanalića. On je duži od distalnog zavijenog kanalića zbog čega u kori bubrega ima više njegovih presjeka oko bubrežnih tjelešaca (2).

Stanice ovog kubičnog epitela sadržavaju brojne mitohondrije i zato imaju acidofilnu citoplazmu. Sa slobodne plohe stanice polaze brojni mikrovili, dugi oko 1 mikrometar, koji čine četkastu prevlaku. Stanice proksimalnog zavijenog kanalića su velike te svaki poprečni presjek sadržava samo 3 – 5 okruglih jezgara.

U apikalnoj citoplazmi epitelnih stanica između polazišta mikrovila ima mnogo pinocitotskih mjehurića, koji nastaju uvrnućem apikalnih membrana, a dovode se u svezu sa sposobnošću stanica proksimalnog kanalića da apsorbiraju makromolekule. Mjehurići sadržavaju makromolekule koje su prošle kroz glomerularni filtar. Bazalni dijelovi ovih stanica imaju brojna uvrnuća membrane i lateralne interdigitacije sa susjednim stanicama, a na bazolateralnim membranama, nalazi se Na/K – ATP-aza koja je odgovorna za prijenos natrija iz tih stanica. Položaj mitohondrija koji su nagomilani na bazi stanice i poredani usporedo s uzdužnom osi stanice, kao i povećanje površine stanične membrane na bazi stanice, upućuju na to da ove stanice sudjeluju u aktivnom prijenosu iona. Glomerularni filtrat iz bubrežnog tjelešca ulazi u proksimalni zavijeni kanalić, u kojem započinju apsorpcija i ekskrecija. Proksimalni zavijeni kanalić apsorbira iz filtrata svu glukozu i aminokiseline te oko 85% natrijeva klorida aktivnim prijenosom uz pomoć Na/K ATP-aze te vodu koja prolazi pasivno difuzijom.

Proksimalni zavijeni kanalić aktivnom tubularnom sekrecijom izlučuje kreatinin iz plazme u filtrat, kao i strane tvari unesene u organizam, npr. para-aminohipurnu kiselinu i penicilin (1).

### 1.1.3. Henleova petlja

Henleova petlja ima oblik slova U i sastoji se od debelog dijela silaznog kraka, tankog dijela silaznog kraka, tankog dijela uzlaznog kraka i debelog dijela uzlaznog kraka koji je po građi sličan distalnom zavijenom kanaliću. U vanjskom dijelu srži debeli dio silaznog kraka, vanjskog promjera oko 60 mikrometara, naglo se suzuje na 12 mikrometara i nastavlja se kao tanki dio silaznog kraka. Približno 1/7 svih nefrona su jukstamedularni nefroni koji su smješteni blizu kortikomedularne granice. Oni su najvažniji za stvaranje gradijenta hipertoničnosti u intersticiju srži što je osnova za stvaranje hipertonične mokraće. Ostali se nazivaju kortikalni nefroni, a svi sudjeluju u procesima filtriranja, apsorpcije i sekrecije. Jukstamedularni nefroni imaju vrlo duge Henleove petlje, koje se protežu duboko u srž i sastoje se od kratkoga debelog dijela silaznog kraka, dugog silaznog i uzlaznog tankog dijela i debelog uzlaznog dijela. Za razliku od njih, kortikalni nefroni imaju vrlo kratke tanke silazne dijelove i nemaju tankih uzlaznih dijelova.

Tanki dio silaznog kraka petlje u potpunosti je propustan za vodu, a cijeli uzlazni krak je za nju nepropustan. U debelom dijelu uzlaznog kraka natrijev klorid izlazi iz kanalića aktivnim prijenosom što u intersticiju srži dovodi do stvaranja gradijenta hipertoničnosti potrebnog za koncentriranje mokraće. Osmotski tlak intersticija na vrhovima sržnih piramida je oko 4 puta veći od osmotskog tlaka (1,2).

### 1.1.4. Distalni zavijeni kanalić

Debeli uzlazni krak Henleove petlje ulazi u koru te nakon kratkog toka postaje zavijen i naziva se distalni zavijeni kanalić i obložen je jednoslojnim kubičnim epitelom, kao i uzlazni krak.

Kao i proksimalni, distalni zavijeni kanalići nalaze se u kori, a razlikuju se od proksimalnih po tome što nemaju četkastu prevlaku ni apikalne kanaliće. Njihova funkcija je prijenos iona zbog čega imaju složena uvrnuća bazalnog dijela membrane udružena s mitohondrijima.

Uz prisutnost aldosterona u dovoljno visokoj koncentraciji u distalnom zavijenom kanaliću se apsorbira natrij, a izlučuju ioni kalija čime se određuje ukupna količina soli i vode u organizmu. Distalni kanalić izlučuje u mokraću i vodik i amonijeve ione (2).

#### 1.1.5. Sabirne cjevčice i cijevi

Na distalne zavijene kanaliće se nastavljaju sabirne cjevčice, a one se udružuju u veće sabirne cijevi. Sabirne cijevi se postepeno proširuju približavajući se vrhovima piramida.

Manje sabirne cjevčice obložene su kubičnim epitelom, a na putu kroz srž njihove stanice postaju više sve do cilindričnih. Nekoliko generacija manjih odvodnih kanalića koji dolaze iz svakog sržnog tračka ulazi u sabirne cijevi u kori pod pravim kutom. Odvodni kanali u srži imaju glavnu ulogu u koncentriraju mokraće (1).

Antidiuretski hormon (ADH) kojeg izlučuje neurohipofiza djeluje na epitel sabirnih cijevi. On se izlučuje kad je unos vode ograničen, a pod njegovim utjecajem epitel sabirnih cijevi postaje propusan za vodu. Voda se apsorbira iz glomerularog filtrata i prenosi u krvne kapilare pa na taj način organizam zadržava vodu (5).

#### 1.1.6. Jukstaglomerularni aparat

Tunika medija dovodne arteriole uz samo bubrežno tjelešce ima promijenjene glatke mišićne stanice. Te jukstaglomerularne stanice imaju citoplazmu ispunjenu sekretnim zrcima i izlučuju enzim renin. Renin djeluje na bjelančevinu plazme angiotenzinogen, tako da nastaje inaktivni decapeptid angiotenzin I. Djelovanjem pretvorbenog enzima, angiotenzin I gubi dvije aminokiseline i postaje aktivni vazopresivni oktapeptid angiotenzin II koji sudjeluje u održavanju krvnog tlaka (2).

#### 1.1.7. Intersticij bubrega

Intersticij bubrega je prostor između mokraćnih kanalića i krvnih i limfnih žila. On zauzima vrlo mali volumen u kori, a povećava se u srži. Intersticijske stanice su žljezdane stanice koje se nalaze u srži i sadržavaju kapljice lipida u citoplazmi te sudjeluju u sintezi prostaglandina i prostaciklina (1).

## 1.2 Embrionalni razvoj bubrega

### 1.2.1. Faze razvoja

Tijekom embrionalnog razvoja bubreg prolazi kroz tri faze: pronephros, mesonephros i metanephros. Pronephros i mesonephros se formiraju, a zatim involuiraju. Pronephros nastaje početkom 4. tjedna i nema nikakvu funkciju. Sastoji se od 7 do 10 nakupina stanica (nefrotoma) u vratnom području (6). Od gornjih nefrotoma nastaju rudimentalni kanalići, koji iščeznu prije nastanka donjih nefrotoma. Pronephros nestaje potkraj 4. tjedna. U mezonephrosu se pojavljuju prvi sekretni kanalići tijekom nestajanja pronephrosa. Kanalići se brzo produžuju i oblikuju petlju u obliku slova S, a na medijalnom kraju u njih urasta klupko kapilara. Prošireni kraj kanalića, koji obuhvaća glomerul, čini Bowmanovu čahuru, koja zajedno s glomerulom čini bubrežno tjelešće. Lateralni krajevi kanalića ulijevaju se u uzdužno postavljen odvodni kanal, koji se naziva kanal mezonephrosa ili Wolffov kanal i koji se ulijeva u kloaku. Gornji kanalići s glomerulima propadaju i većina ih nestaje dok se donji kanalići mezonephrosa još diferenciraju (8). Treći bubreg, metanephros ili definitivni bubreg, pojavljuje se u 5. tjednu. Njegovi se sekretni kanalići razvijaju od metanefrogenog mezoderma na isti način kao u mezonephrosu (7).

### 1.2.2. Sustav odvodnih kanala

Odvodni kanali razvijaju se od mokraćovodnog pupoljka, koji izrasta iz donjeg dijela Wolffova kanala i prodire u metanefrogeno tkivo koje prekriva njegov distalni kraj. Zatim se distalni kraj pupoljka proširi i čini primitivnu bubrežnu nakapnicu, a onda se podijeli u velike bubrežne vrčeve (*calyces renales majors*). Tijekom prodiranja u metanefrogeno tkivo svaki se veliki vrč podijeli u dva nova pupoljka, koji se dalje uzastopno dijele sve dok ne nastane 12 ili više generacija kanalića. Kanalići druge generacije povećavaju se i apsorbiraju kanaliće treće i četvrte generacije te tako nastaju mali bubrežni vrčevi (*calyces renalis minores*). Tijekom daljnjeg razvoja odvodni (sabirni) kanalići pete i sljedećih generacija znatno se izdužuju i teku konvergentno prema malom bubrežnom vrču. Na taj način se oblikuje bubrežna piramida. Od mokraćovodnog pupoljka

nastaju mokraćovod, nakapnica, veliki i mali bubrežni vrčevi te oko 1 do 2 milijuna odvodnih kanalića (sabirnih cjevčica) bubrega (6).

### 1.2.3. Nefroni

Oko distalnog kraja svakog novonastalog odvodnog kanalića zgusne se metanefrogeno tkivo, a to zgusnuće se naziva kapa metanefrogenog tkiva. Stanice u kapi oblikuju male bubrežne mjehuriće pod indukcijskim utjecajem kanalića. Mjehurići se izdužuju i tvore male kanaliće u obliku slova S. Slobodni kraj svakog kanalića obuhvati klupko kapilara (glomerul). Kanalić s glomerulom čini osnovu za nefron. Proksimalni kraj svakog nefrona čini Bowmanova čahura, u koju se duboko utiskuje glomerul, a distalni kraj se spoji s jednim od odvodnih kanalića te se tako uspostavi put od Bowmanove čahure do sustava odvodnih kanala bubrega. Izduživanjem i savijanjem sekretnog kanalića oblikuju se proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić. Nefroni se stvaraju do rođenja i tada ih je u svakom bubregu prisutno otprilike 1 milijun (6).

### 1.3. Kongenitalne anomalije mokraćnog sustava

Kongenitalne anomalije mokraćnog sustava su česte i pogađaju oko 10% populacije. Čine oko 30% svih kongenitalnih anomalija te oko 40% svih bubrežnih bolesti. Gotovo polovina slučajeva kronične bubrežne insuficijencije u djece je uzrokovana anomalijama mokraćnog sustava. Posebno su važne anomalije bubrežnog parenhima koje mogu biti teške i nerijetko nespojive sa životom (9). Anomalije variraju u težini, a najčešće su opstruktivne naravi i ometaju tok mokraće. Takvi poremećaji mogu rezultirati ponavljajućim infekcijama mokraćnog sustava i retencijom mokraće u mokraćnim putovima, što može oštetiti bubrežni parenhim i u konačnici dovesti do zatajenja bubrega (10). Osobe s kongenitalnim anomalijama mogu imati jedan ili više poremećaja u radu bubrega ili mokraćnog sustava. Kod parnih struktura, poput bubrega i uretera, mogu biti zahvaćeni jedan ili oba. Mnogo različitih poremećaja u razvoju klasificira se kao kongenitalna anomalija mokraćnog sustava, uključujući nerazvijenost ili odsutnost bubrega

(bubrežna hipodisplazija ili ageneza), multicistični displastični bubreg, nakupljanje urina u bubrezima (hidronefroza), dodatni ureter koji vodi do bubrega (dupleks bubrega ili duplicirani sustav sakupljanja), blokada u ureteru gdje se spaja s bubregom (opstrukcija ureteropelvičkog spoja), nenormalno širok ureter (megaureter), povrat protoka mokraće iz mokraćnog mjehura u mokraćni kanal (vezikoureteralni refluks) i abnormalnu membranu u mokraćnoj cijevi koja blokira protok urina iz mokraćnog mjehura (stražnja valvula uretre) (11,12).

#### 1.4. Snail i epitelno-mezenhimalna tranzicija

Snail je obitelj transkripcijskih faktora koji potiču represiju molekule E-kadherin i reguliraju epitelno mezenhimalnu tranziciju (EMT) tijekom embriogeneze. Snail je cinkov prst (engl. *zinc – finger*) transkripcijski represor koji suprimira ekspresiju ektodermalnih gena u mezodermu i potiče ekspresiju mezenhimalnih gena (13). Vežući se na E-box (E-kadherin promotorsku regiju), Snail suprimira ekspresiju adhezijske molekule, što potiče čvrsto vezane epitelne stanice na razdvajanje i migraciju. Na taj se način gotovo statične epitelne stanice pretvaraju u pokretljive i invazivne mezenhimalne stanice koje imaju svojstva matičnih stanica (14). EMT je ključni proces u embrionalnom razvoju, a dokazana je i važna uloga u tumorskoj invaziji i metastaziranju, kao i u cijeljenju rana i fibrozi (15). Jedna od značajki EMT-a je gubitak funkcije E-kadherina i smatra se da EMT-inducirajući faktori potiču epitelnu disorganizaciju tako što utječu na funkciju E-kadherina. Epitelne stanice izražavaju velik broj E-kadherina, dok mezenhimalne stanice izražavaju N-kadherin, fibronektin i vimentin (16). Tijekom embriogeneze, implantacija i formiranje placente se povezuju s EMT, a kasnije, tijekom gastrulacije omogućuje stanicama ulazak u primitivnu prugu. Primitivna pruga invaginira i stvara mezoendoderm koji se kasnije odvaja u mezoderm i endoderm kroz EMT. Nakon ozljede i oštećenja tkiva, smatra se da EMT ima veliku ulogu i u fiziologiji i u patologiji cijeljenja (17). Primjerice, kod kožnih oštećenja, rubni keratinociti prolaze kroz EMT i gubeći svoj epitelni fenotip, postaju stanice mezenhimalnog fenotipa i migriraju po rani. Kasnije dolazi do reepitelizacije ili MET (mezenhimalno – epitelna tranzicija) kad rana zacijeli (18). Iako je EMT nužna za normalno cijeljenje, nekontrolirana kontinuirana tranzicija epitelnih stanica u miofibroblaste može dovesti do fibroze. Smatra se da EMT ima veliku ulogu i u stvaranju malignih tumora. Povezanost između prolaska kroz EMT i

stjecanja pluripotencije pokazuje da aktivacija EMT-a služi kao glavni mehanizam stvaranja karcinomskih stanica (15).

U bubrezima, ekspresija SNAIL-a je ključna za dolazak migrirajućih embrionalnih stanica na svoje mjesto. Reekspresija SNAIL-a u postnatalnom bubregu može inducirati spontanu fibrozu. Ekspresija SNAIL-a se povezuje s fibrozom kod transplantacije bubrega, dijabetičke nefropatije, IgA nefropatije, policistične bolesti bubrega, ali i kod akutne ozljede bubrega (engl. *acute kidney injury – AKI*) (19). Kod opstrukcije praćene upalom bubrega, veliki broj leukocita infiltrira bubrežni intersticij i stvara citokine. Interleukin 1- $\alpha$  i engl. *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) su uključeni u aktivaciju SNAIL-a i EMT tubularnih epitelnih stanica. Indukciju SNAIL-a također potiču hipoksija, kronična hiperglikemija, ciklosporin A, izloženost kadmiju i aktivnost PTHrP (engl. *parathyroid hormone related protein*). U kasnim stadijima fibroze, kad se renalna disfunkcija stabilizira, uremički toksini, kao što su urična kiselina, indoksil sulfat i p-krezol sulfat održavaju ekspresiju SNAIL-a i mezenhimalnu orijentaciju tubularnih epitelnih stanica (14).

### 1.5. Mutacija DAB1

Za razvoj mozga sisavaca potrebna je koordinirana migracija neurona da bi se pravilno po slojevima razvile laminarne strukture u kori velikog i malog mozga. Ovi procesi su poremećeni kod mutacije u reelinu koja uzrokuje malpoziciju neurona. Reelin je veliki protein kojeg izlučuju prvi neuroni koji koordinira pozicioniranje stanica tijekom neurološkog razvoja. Mutacija u reelinu kod *reeler* miševa uzrokuje ataksiju (20).

Dab1 je fosfoprotein koji djeluje kao unutarstanični adapter u putovima protein kinaza. Analiza ekspresije pokazuje da je dab1 protein eksprimiran u populaciji neurona izloženih Reelinu. Slični fenotipi *reeler-a*, *scrambler-a*, *yotari* i *mdab1 null* miševa ukazuju na to da Reelin i mDab1 djeluju kao signalne molekule koje reguliraju položaj stanica u mozgu u razvoju (20).

*Scrambler* mutant miš (*scm*) ima spontanu autosomno recesivnu mutaciju s fenotipom sličnim *reeler-u* dok su se *yotari* mutacije (*yot*) pojavile tijekom generacija miševa koji nose poremećaj gena koji kodira receptor za inozitol-1,4,5-trisfosfat10. *Scrambler* i *yotari* miševi imaju mutirane oblike *mdab1* messenger RNA te smanjen ili potuno odsutan mDab1 protein (20,21).

*Yotari* mutanti prepoznatljivi su po nestabilnom hodu i drhtanju te po ranoj smrti za vrijeme odvikavanja od majke. Mali mozak homozigotnih *yotari* miševa je hipoplastičan. Molekularni i granulirani stanični sloj mogu se prepoznati, ali Purkinjeove stanice su raspršene po zrnastom sloju i bijeloj tvari. Normalno, mali mozak se pri rođenju sastoji od sloja Purkinjeovih stanica debljine nekoliko stanica prekrivenih površinskim vanjskim zrnatim slojem. Počevši od otprilike P5, Purkinjeove stanice se raspršuju i formiraju tanki sloj, a granulirane stanice vanjskog zrnatog sloja proliferiraju i migriraju prema unutra te tako tvore unutarnji granulirani sloj. Do P25, normalni mali mozak ima vanjski, stanični sloj (molekulski sloj), tanki sloj Purkinjeovih stanica s dendritičkim lukovima koji se protežu u molekularni sloj, široki unutarnji granulirani sloj i ispod njega bijelu tvar. Zreli mali mozak pokriva srednji mozak. Nasuprot tome, mali mozak *Dab1* mutanata na P25 je mali i nema brazde, a srednji mozak je nepokriven. Purkinjeove stanice prisutne su u središnjoj masi i njihovi su dendriti usmjereni nasumično. Zrnate stanice su malobrojne i premda neke migriraju prema unutra, većina ostaje površinski. Poremećeni su i laminarna struktura moždane kore i hipokampalna formacija. Kora velikog mozga nema prepoznatljive stanične slojeve koji su prisutni kod divljeg tipa. Hipokampus i gyrus dentatus u *Dab1*<sup>-/-</sup> miševa su neprepoznatljivi. Normalno, veliki piramidalni neuroni tvore diskretne slojeve u gyrusu dentatusu i CA1 i CA3 regijama hipokampus, ali u *Dab1*<sup>-/-</sup> veliki piramidalni neuroni su raspršeni (22).

*Dab1* mutanti prepoznatljivi su po tremoru tijela i poremećaju hoda, a imaju i manju tjelesnu težinu u odnosu na zdravu skupinu. Na testovima s vodoravnom šipkom i nagnutim ili okomitim mrežama imaju očit nedostatak motoričke koordinacije u kombinaciji sa slabijom čvrstoćom hvatanja šipke ili mreže (23). Pokazuju manju anksioznost u testovima s labirintom. Kod testova na otvorenom, *Dab1*<sup>-/-</sup> miševi pokazuju veći odgovor na smrzavanje, blažu reakciju na dodir i bržu reakciju na zvuk. Također, prisutan je i poremećaj u čišćenju prvenstveno stražnjeg dijela tijela, dok je pranje lica i lizanje prednjih šapa normalno (24). Kad ih se uhvati za rep, pokazuju patološki refleks, stezanje udova, karakterizirano držanjem zajedno prednjih ili stražnjih udova ili sva četiri zajedno, slično položaju šišmiša (21).

DAB1 ima potencijalno značajnu ulogu i tijekom fetalnog razvoja bubrega. Pokazuje snažan izražaj u proksimalnim i distalnim tubulima te u glomerulima što upućuje na njegovu regulatornu ulogu u stvaranju tubula ili u održavanju funkcije tijekom razvoja (29).



Uloga SNAIL-a u nekim procesima u bubregu kao što su embriogeneza, nastanak malignih tumora i fibroza je tema mnogih istraživanja, ali do sada nitko nije istraživao ulogu SNAIL-a u bubrezima  $Dab1^{-/-}$  miševa.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti povezanost mutacije DAB1 gena s izražajem Snail bjelančevine u bubregu. Promatrali smo izražaj Snail-a u 11. i 14. dana starom bubregu DAB1<sup>-/-</sup> miša uspoređujući ga sa zdravom kontrolnom skupinom iste starosti.

#### HIPOTEZE

1. Dab1 ima ulogu u fetalnom razvoju bubrega te očekujemo da će mutacija na tom genu izazvati oštećenje bubrega
2. Izražaj Snail-a je povišen kod brojnih patoloških stanja bubrega, pa očekujemo porast izražaja u bubrezima Dab1<sup>-/-</sup> miša

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

### 3.1. Etika

Istraživanje i sve protokole odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i provedeni su prema Zakonu o zaštiti životinja.

### 3.2. Uzgajanje Dab1 knock-out miša i prikupljanje uzoraka

Kao Dab1 nulte konvencionalne mutante koristili smo *yotari* (Dab1<sup>-/-</sup>) miševе. PCR početnice koje su korištene za genotipizaciju miševa bile su, *yotari*: GCCCTTCAG-CATCACCATGCT i CAGTGAGTACATATTGTGTGAGTTCC, divlji tip: GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CCTTGTTTCTTGTTGCTTAGAG C57BL / 6N. Miševi su smješteni u skupine u kavezima s pristupom hrani i vodi, u prostoriji s kontroliranom temperaturom i svjetlosti (dan/noć ciklusi od 12h). 11. (11P) i 14. (14P) postnatalni dan miševi su anestetizirani pentobarbitalom i transkardijalno su perfuzirani s fosfatnom pufernom otopinom (PBS, pH 7,2) i 4% paraformaldehidom (PFA) u 0,1 M PBS. Bubrezi su uklonjeni i fiksirani s istom otopinom tijekom noći za daljnju analizu. Uzorci bubrega su izrezani u kocke i ugrađeni u parafinske blokove da bi se mogli izrezati u sekcije debljine 7 mikrometara. Nakon rezanja, uzorci su deparafinizirani koristeći ksilen i alkohol (95%, 75% i 50%) i zatim su temeljito isprani destiliranom vodom i 12 minuta ugrijani u mikrovalnoj pećnici s puferom natrijevim citratom (pH 6,0) na 95 ° C. Uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi prije inkubacije s primarnim protutijelom.

### 3.3. Imunohistokemija

Primarno protutijelo, Goat anti-Snail iz Abcam (ab53519, Cambridge, Velika Britanija), razrijeđeno je u omjeru 1: 500 u razrjeđivaču Dako REAL protutijela (Dako Danska A \ S, Glostrup, Danska) i zatim nanoseno na tkivo uzorka koji je ostavljen preko noći u vlažnoj i tamnoj komori na sobnoj temperaturi. Uzorci su isprani s PBS-om i na njih je nanoseno, u omjeru 1:400, sekundarno protutijelo, Rhodamine Red<sup>TM</sup>-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat<sup>++</sup> IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch laboratories, inc., 705-295-003) s inkubacijom od jednog sata u

vlažnoj i tamnoj komori. Također je izvedeno i 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) bojanje za prikazivanje jezgara i hemalaun-eozin bojanje. Obojani uzorci bubrega promatrani su i snimljeni pomoću BX51 mikroskopa (Olympus, Tokio, Japan) opremljenog DP71 digitalnom kamerom (Olympus, Tokyo, Japan).

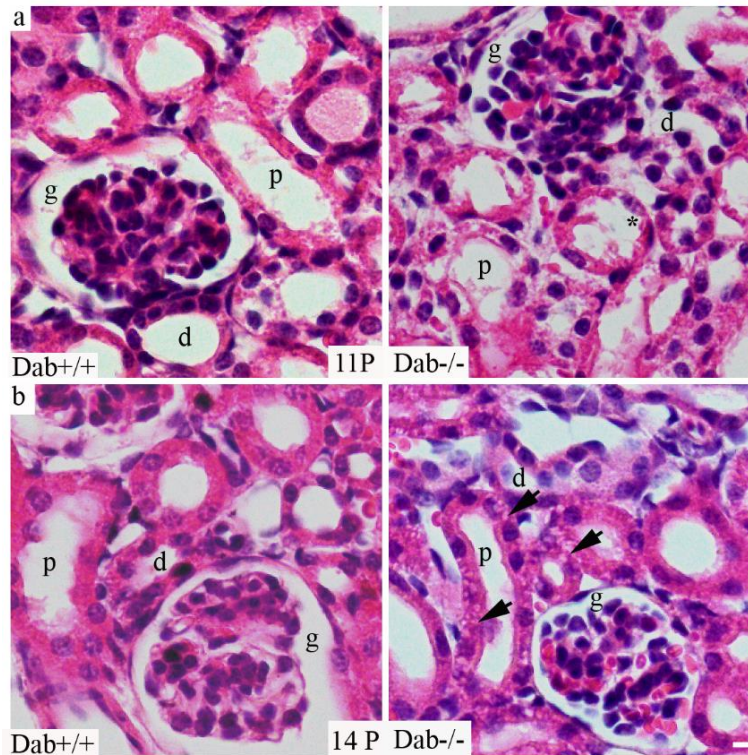
### 3.4. Analiza podataka i statistika

Nakon snimanja slike su obrađene sa ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) i Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA, USA). Analizirano je 13 uzoraka gdje smo promatrali proksimalne zavijene kanaliće, distalne zavijene kanaliće i glomerule u kori bubrega pod povećanjem objektiva x40. Jačina signala je semikvantitativno podijeljena u četiri skupine: odsutnost signala (-), blagi signal (+), umjereno jaki signal (++) i jaki signal (+++). Izračunat je i postotak Snail pozitivnih stanica.

Kruskall-Wallis test je korišten za statističku analizu razlike između mutirane i kontrolne skupine u proksimalnom i distalnom tubulu te glomerulu. Rezultati su prikazani kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon. Podaci su analizirani u GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## **4. REZULTATI**

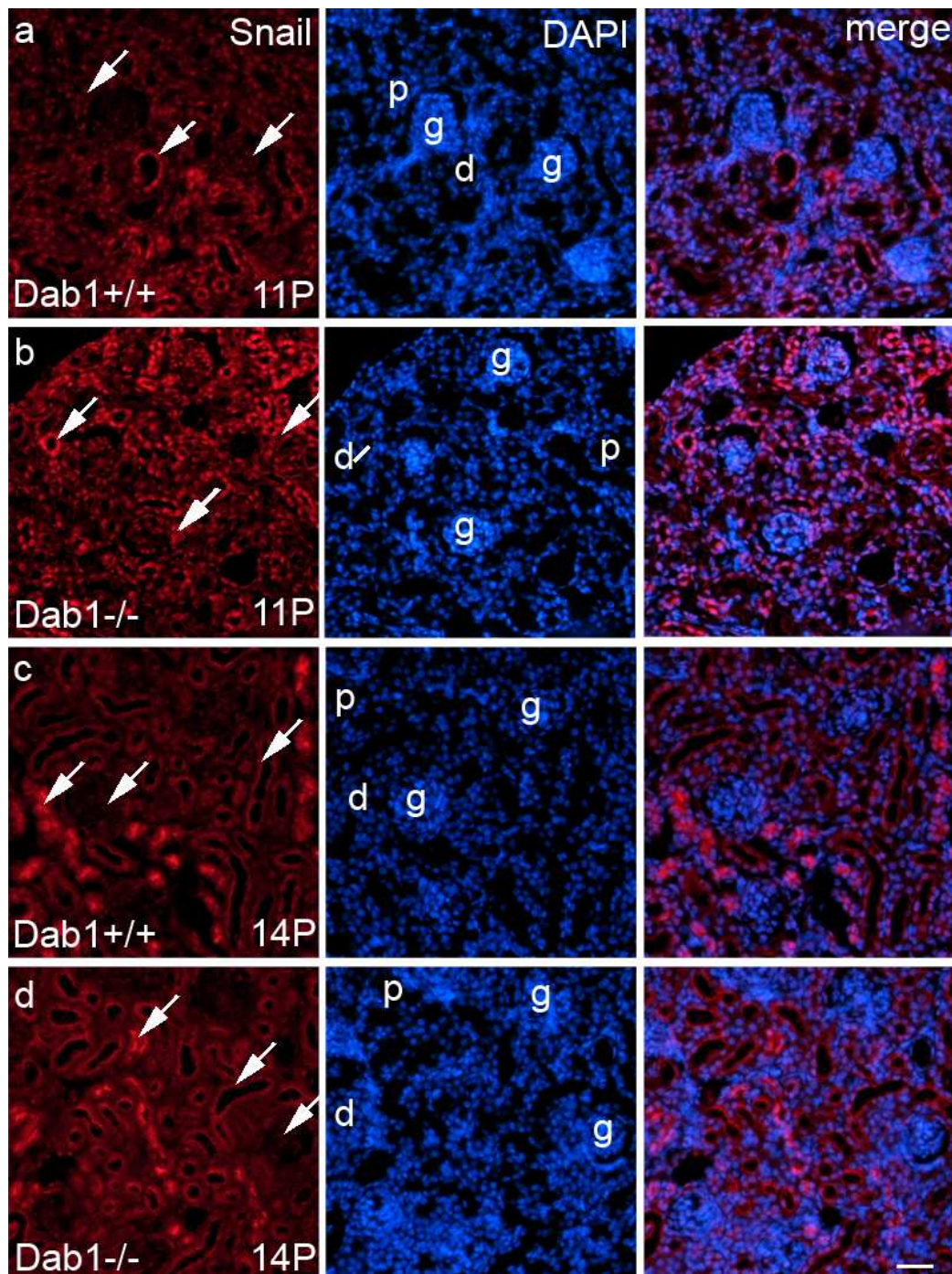
Bojanje hemalaun-eozinom nije pokazalo značajnu razliku između  $Dab1^{-/-}$  miševa i kontrolne skupine u 11. postnatalnom danu (Slika 1.a). Međutim, u 14. postnatalnom danu, vidljivo je pojačano stvaranje vakuola (označeno strelicama) u proksimalnim tubulima  $Dab1^{-/-}$  miša (Slika 1.b).



*Slika 1.* Hemalaun-eozin bojanje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa ( $Dab^{+/+}$ ) i knock-out ( $Dab^{-/-}$ ). a) Bubrezi miševa žrtvovanih 11. postnatalnog dana (11P). Tijekom procesa fiksacije došlo je do propadanja velikog dijela bubrežnih struktura (zvjezdica, \*). b) Bubrezi miševa žrtvovanih 14. postnatalnog dana (14P). U proksimalnim tubulima knock-out životinje je vidljivo pojačano stvaranje vakuola (strelice). g - glomerul, p - proksimalni zavijeni kanalić, d - distalni zavijeni kanalić. Mjerna ljestvica  $20\mu\text{m}$  odnosi se na sve panele.

Imunofluorescencijskim bojanjem se prikazuje različita jačina signala između pojedinih struktura kod divljeg tipa i kod  $Dab1^{-/-}$  miša. Najjači signal kod jednog i drugog tipa pokazuju stanice distalnog tubula. U 11. postnatalnom danu se vidi ulazak Snail-a u jezgru stanica glomerula  $Dab1^{-/-}$  miša (Slika 2.b).



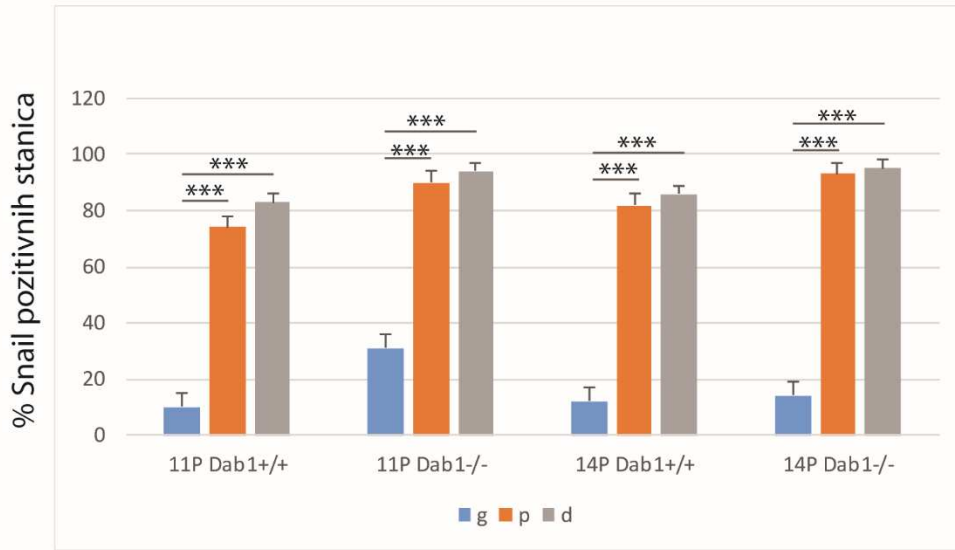


*Slika 2.* Imunofluorescencijsko bojanje na Snail (strelice) i DAPI (plavo obojane jezgre) postnatalnog bubrega miša divljeg tipa (*Dab1*<sup>+/+</sup>) (a i c) i miša kojemu je isključen *Dab1* (*Dab1*<sup>-/-</sup>) (b i d); merge – preklapljene slike bojanja na Snail (strelice) i DAPI. Uzete su reprezentativne slike dva postnatalna dana 11P (a i b) i 14P (c i d); P – postnatalni dan, g – glomerul, d – distalni zavijeni kanalić, p – proksimalni zavijeni kanalić. Mjerna ljestvica 20  $\mu$ m odnosi se na sve panele.

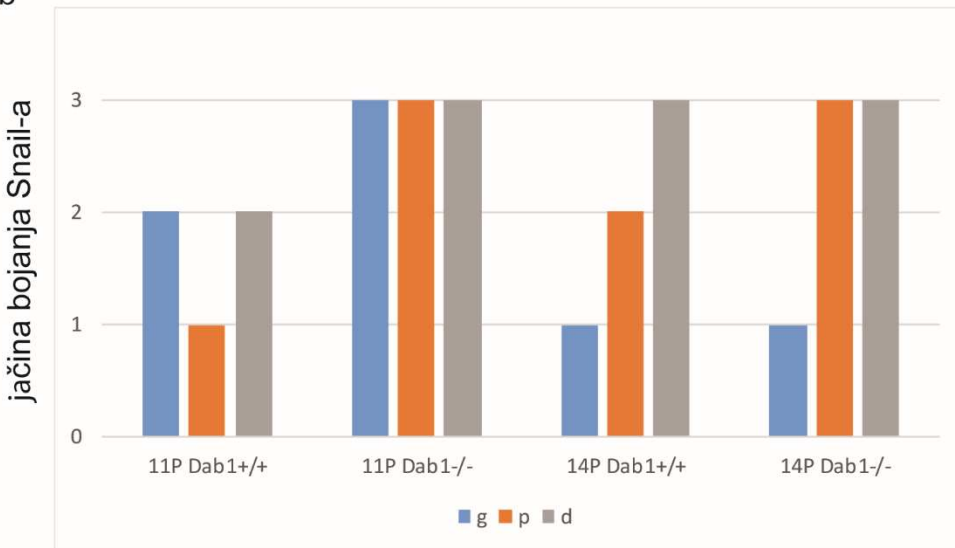
U 11. postnatalnom danu, bilo je 10% Snail pozitivnih stanica u glomerulu divljeg tipa, a 31% u glomerulu Dab1<sup>-/-</sup> miša. Nešto manja razlika u broju stanica u 11. postnatalnom danu se vidi u proksimalnim tubulima (74% kod divljeg tipa, 90% kod Dab1 mutiranog) i u distalnim tubulima (83% kod divljeg i 94% kod Dab1 mutiranog) (Slika 3.a). 14. dan postnatalno, razlika u broju Snail pozitivnih stanica u glomerulu divljeg i mutiranog tipa se smanjuje (12% kod Dab1<sup>+/+</sup> i 14% kod Dab1<sup>-/-</sup> miša). Isti dan broj pozitivnih stanica u proksimalnom tubulu Dab1 mutiranog tipa je bio 93% u odnosu na 82% kod divljeg tipa, a u distalnom tubulu 95% kod mutiranog u odnosu na 86% kod divljeg tipa (Slika 3.a).

Najjači signal stanice glomerula, proksimalnog i zavijenog tubula pokazuju 11. dan postnatalno kod Dab1<sup>-/-</sup> miša, gdje je svima jačina signala bila 3 (jaki izražaj) u usporedbi s divljim tipom gdje je jačina signala u glomerulu i distalnim tubulima bila 2 (umjereni izražaj), a u proksimalnom tubulu 1 (blagi izražaj) (Slika 3.b). 14. dan postnatalno, jačina signala u glomerulima mutiranog tipa pada na 1 (kao i kod divljeg tipa), a u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima ostaje 3. Kod divljeg tipa 14. postnatalni dan jačina signala u stanicama tubula raste u odnosu na 11. dan pa je tako u proksimalnim kanalićima 2, a u distalnim 3 (Slika 3.b).

a



b



Slika 3. Distribucija postotka Snail pozitivnih stanica (a) i jačine bojanja Snail-a (b) tijekom 11P I 14P postnatalnog dana u tkivu bubrega miša divljeg tipa ( $Dab1^{+/+}$ ) i miša kojemu je isključen  $Dab1$  ( $Dab1^{-/-}$ ). Jačina signala: 1 – blagi izražaj, 2 – umjereni izražaj, 3 – jaki izražaj; g – glomerul, p – proksimalni zavijeni kanalići, d – distalni zavijeni kanalići. Podatci su testirani Kruskal–Wallis testom i prezentirani kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon. Signifikantna razlika je prikazana kao \*\*\*  $p < 0.0001$

## **5. RASPRAVA**

Bojanje hemalun-eozinom je pokazalo pojačanu vakuolizaciju u proksimalnim tubulima 14. postnatalni dan kod Dab1<sup>-/-</sup> miševa. Henics i Wheatley smatraju da je vakuolizacija adaptivni fiziološki odgovor čiji je cilj vjerojatno „ograničenje štete“ (25). Shubin i sur. su pokazali da vakuolizacija može biti posljedica djelovanja citotoksičnih faktora, ali da u nekim slučajevima može biti i inicijalni faktor koji uzrokuje metaboličke promjene i vodi u smrt stanice. Iako je prisutna kod brojnih patoloških stanja, točna uloga vakuolizacije u smrti ili oporavku stanice još nije poznata (26).

Simon-Tillaux i Hertig smatraju da Snail ima ključnu ulogu u procesima odgovornim za renalnu fibrogenezu, uključujući mezenhimalno reprogramiranje tubularnih epitelnih stanica, oštećenje metabolizma masnih kiselina, zaustavljanje staničnog ciklusa i upalne promjene oko tubularnih epitelnih stanica (27). Naši rezultati su pokazali da je izražaj Snail-a bio najveći 11. dan postnatalno, tada je bio najviši postotak Snail pozitivnih stanica i najjači signal bojanja. Balzer i Susztak su provodili istraživanje na miševima kojima je inducirana fibroza bubrega i pokazali su da je fibroza bila značajno manje izražena kod onih miševa koji su imali deficijenciju Snail-a. Takvi rezultati upućuju na to da bi blokiranje ekspresije Snail-a moglo spriječiti oštećenje bubrega bubrega (28). Slične rezultate pokazuje i Fiorentino, koja govori o ulozi Snail-a u regeneraciji tubularnih epitelnih stanica. Kada se zbog trajne ozljede ne može postići regeneracija tubula, tubularne epitelne stanice ulaze u zastoj staničnog ciklusa u G2/M fazi i ostaju u tubulu u nediferenciranom stanju, zaštićeni od stanične smrti. Pokazalo se da je zastoj stanične proliferacije prvi događaj u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji tijekom fibroze bubrega. U modelima miša s fibrozom, inaktiviranje Twist1 i / ili Snail poništava zaustavljanje staničnog ciklusa i tubul se može popraviti. Nadalje, u *in vitro* ispitivanjima mišjih tubularnih epitelnih stanica, u kojima je djelomični EMT induciran TGF-β1 stimulacijom, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa koji se može povratiti inaktivacijom Snail i Twist1 (30).

Wu i Zhou smatraju da Snail mora ući u jezgru stanice kako bi ostvario svoj učinak jer citoplazmatski Snail ima kratak poluvijek i razgrađuju ga ubikvintin proteaze (14). U našem istraživanju, 11. dan postnatalno Snail ulazi u stanice glomerula što može upućivati na to da u glomerulima ostvaruje svoj najveći učinak jer se tu ne razgrađuje. Nadalje, blokada ulaska Snail-a u jezgru bi također mogla biti jedna od metoda zaustavljanja daljnjeg oštećenja bubrega (14).

Uloga Snail-a u bubrezima Dab1 knock-out miša do sada nije bila istraživana. Racetin i sur. su pokazali da je prisutnost DAB1 u fetalno doba ključna za normalan razvoj i funkciju bubrega (29). Naši rezultati su pokazali porast izražaja Snail-a u bubrezima što može upućivati na oštećenje bubrega zbog kongenitalne anomalije uzrokovane mutacijom Dab1 gena.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Snail ima ključnu ulogu u epitelno mezenhimalnoj tranziciji u fetalno doba, a postnatalno njegov izražaj raste u nekim patološkim stanjima kao što su fibroza i karcinom.
2. Kod  $Dab1^{-/-}$  miševa najveći porast izražaja Snail-a je zabilježen 11. postnatalni dan, a tada ulazi i u jezgre stanica glomerula.
3. Ulazak Snail-a u jezgru je ključan za ostvarivanje njegove funkcije jer ga u citoplazmi brzo razgrađuju ubikvintin proteaze.
4. Porast Snail-a upućuje na moguće oštećenje bubrega uzrokovano mutacijom na  $Dab1$  genu.
5. Inaktivacija Snail-a poništava zaustavljanje staničnog ciklusa i oštećene tubularne stanice se mogu popraviti
6. Potencijalni lijekovi koji bi blokirali Snail ili njegov ulazak u jezgru stanice bi se mogli koristiti u liječenju fibroze ili karcinoma.



## **7. POPIS LITERATURE**

1. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga, 2005.
2. Antonio Madrazo-Ibarra; Pradeep Vaitla. Histology, Nephron. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
3. Rizaldy P. Scott and Susan E. Quaggin. The cell biology of renal filtration. J Cell Biol. 2015;209:199–210.
4. Ian Murray; Michael A. Paolini. Histology, Kidney and Glomerulus. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
5. Brian Cuzzo, Sandeep A. Padala, Sarah L. Lappin. Vasopressin (Antidiuretic Hormone, ADH). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
6. Sadler TW. Medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga, 2009.
7. Sana Rehman; Danish Ahmed. Embryology, Kidney, Bladder, and Ureter. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
8. K S Ludwig, L Landmann. Early Development of the Human Mesonephros. Anat Embryol (Berl) 2005;209:439-47.
9. Duško Mardešić i suradnici, Pedijatrija Školska knjiga, Zagreb, 2003.
10. Capone VP, Morello W, Taroni F, Montini G. Genetics of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: The Current State of Play. Int J Mol Sci. 2017;18:796.
11. Nicolaou N, Renkema KY, Bongers EM, Giles RH, Knoers NV. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. Nat Rev Nephrol. 2015;11:720-31.
12. Weber S, Moriniere V, Knüppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM et al. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. J Am Soc Nephrol. 2006;17:2864-70.
13. William A. Paznekas, Kazuki Okajima, Michael Schertzer, Stephen Wood, Ethylin Wang Jabs. Genomic Organization, Expression, and Chromosome Location of the Human SNAIL Gene (SNAI1) and a Related Processed Pseudogene (SNAI1P). Genomics, 1999;62;42–9.
14. Yadi Wu & Binhua P. Zhou. Snail, Cell Adhesion & Migration 2010;4:199-203.
15. Agnès Boutet, Miguel Esteban, Patrick H. Maxwell & M. Angela Nieto. Reactivation of Snail Genes in Renal Fibrosis and Carcinomas: A Process of Reversed Embryogenesis? Cell Cycle, 2007;6:638-42.

16. Ana Villarejo, Álvaro Cortés-Cabrera, Patricia Molina-Ortíz, Francisco Portillo, Amparo Cano. Differential Role of Snail1 and Snail2 Zinc Fingers in E-cadherin Repression and Epithelial to Mesenchymal Transition. *J Biol Chem* 2014;289:930-41.
17. Ethan A. Carver, Rulang Jiang, Yu Lan, Kathleen F. Oram, Thomas Gridley. The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol Cell Biol*. 2001;21:8184-8.
18. Cynthia E. Weber, MD, Neill Y. Li, Philip Y. Wai, MD, and Paul C. Kuo, MD. Epithelial-Mesenchymal Transition, TGF- $\beta$ , and Osteopontin in Wound Healing and Tissue Remodeling After Injury. *J Burn Care Res*. 2012;33:311-8.
19. Agnès Boutet, Cristina A De Frutos, Patrick H Maxwell, M José Mayol, J Romero, M Angela Nieto. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J*. 2006;25:5603-13.
20. M Sheldon, D S Rice, G D'Arcangelo, H Yoneshima, K Nakajima, K Mikoshiba et al. Scrambler and Yotari Disrupt the Disabled Gene and Produce a Reeler-Like Phenotype in Mice. *Nature* 1997;389:730-3.
21. H Yoneshima, E Nagata, M Matsumoto, M Yamada, K Nakajima, T Miyata et al. A Novel Neurological Mutant Mouse, Yotari, Which Exhibits Reeler-Like Phenotype but Expresses CR-50 antigen/reelin. *Neurosci Res* 1997;29:217-23.
22. B W Howell, R Hawkes, P Soriano, J A Cooper. Neuronal Position in the Developing Brain Is Regulated by Mouse disabled-1. *Nature* 1997;389:733-7.
23. Jacquelin C, Strazielle C, Lalonde R. Neurologic function during developmental and adult stages in Dab1(scml) (scrambler) mutant mice. *Behav Brain Res* 2012;226:265-73.
24. Lalonde R, Lefebvre A, Jacquelin C, Strazielle C. Abnormal grooming activity in Dab1-scml (scrambler) mutant mice. *Behav Brain Res* 2012;233:24-8.
25. T Henics, D N Wheatley. Cytoplasmic Vacuolation, Adaptation and Cell Death: A View on New Perspectives and Features. *Biol Cell* 1999;91:485-98.

26. Andrey V. Shubin, Ilya V. Demidyuk, Alexey A. Komissarov, Lola M. Rafieva, Sergey V. Kostrov. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*. 2016;7:55863–89.
27. Noémie Simon-Tillaux, Alexandre Hertig. Snail and kidney fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2017;32:224-33.
28. Michael S. Balzer, Katalin Susztak. The interdependence of renal epithelial and endothelial metabolism and cell state. *Sci. Signal*. 2020;13:eabb8834.
29. Anita Racetin, Marija Jurić, Natalija Filipović, Ivana Šolić, Ivona Kosović, Merica Glavina Durđov et al. Expression and Localization of DAB1 and Reelin During Normal Human Kidney Development. *Croat Med J*. 2019;60:521-31.
30. Arianna Fiorentino. Glomerulogenesis and renal tubular differentiation: Role of HNF1 $\beta$ . 2016.

## **8. SAŽETAK**

## NASLOV: IZRAŽAJ BJELANČEVINE SNAIL U POSTNATALNOM BUBREGU DAB1<sup>-/-</sup> MIŠA

**Cilj:** Snail je transkripcijski faktor koji sudjeluje u regulaciji epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) suprimirajući ekspresiju ektodermalnih gena u mezodermu i potičući ekspresiju mezenhimalnih gena. EMT je ključni proces u embrionalnom razvoju, a postnatalno se povezuje s mnogim patološkim stanjima, kao što su karcinogeneza i fibroza. Ekspresija Dab1 gena je ključna za normalan neurološki razvoj, ali njegov utjecaj na razvoj bubrega je još uvijek nedovoljno istražen. Analizirajući izražaj Snail-a u bubregu, istraživali smo postoji li povezanost između mutacije na Dab1 genu i oštećenja bubrega.

**Materijali i metode:** analizirali smo uzorke bubrega Dab1<sup>-/-</sup> miševa starih 11 i 14 dana i usporedili ih sa zdravom kontrolnom skupinom iste dobi. Na uzorke smo nanijeli primarno, a zatim i sekundarno protutijelo te smo promatrali izražaj Snail-a u proksimalnim tubulima, distalnim tubulima i glomerulima u kori bubrega. Također smo koristili i bojanje hemalaun-eozinom i DAPI bojanje.

**Rezultati:** Najveći broj Snail pozitivnih stanica bio je 11. dan u distalnim tubulima Dab1 knock-out miša, a tada se vidi i ulazak Snail-a u jezgru glomerula. Najjači signal stanice proksimalnog tubula, distalnog tubula i glomerula u Dab1<sup>-/-</sup> miša pokazuju 11. dan, a 14. jačina signala u glomerulima se smanjuje, a u proksimalnom i distalnom tubulu ostaje ista. 14. postnatalni dan primjećeno je pojačano stvaranje vakuola u proksimalnim tubulima Dab1<sup>-/-</sup> miša. Kod kontrolne skupine, jačina bojanja Snail-a se povećava 14. postnatalni dan u proksimalnim i distalnim tubulima, dok se u glomerulima smanjuje u odnosu na 11. dan.

**Zaključak:** Naši rezultati pokazuju veći porast Snail-a u bubregu knock out miša u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, što upućuje na to da Dab1 gen ima veliku ulogu u razvoju bubrega i njegova mutacija potencijalno uzrokuje oštećenja. Budući da do sada uloga Snail-a u bubrezima Dab1<sup>-/-</sup> miša još nije istražena, potrebno je provesti još istraživanja.

## **9. SUMMARY**

## **TITLE:** EXPRESSION OF SNAIL IN THE POSTNATAL KIDNEY OF DAB1<sup>-/-</sup> MOUSE

**Objective:** Snail is a transcription factor that has an important role in the regulation of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by suppressing the expression of ectodermal genes in the mesoderm and stimulating the expression of mesenchymal genes. EMT is a crucial process in embryonic development, postnatally associated with carcinogenesis and fibrosis. Dab1 expression is crucial for normal neurological development, but its impact on renal development is still insufficiently reaserched. Analyzing the expression of Snail in the kidney, we investigated whether there is a link between mutations in the Dab1 gene and kidney damage.

**Materials and methods:** We analyzed kidney samples of Dab1<sup>-/-</sup> mice aged 11 and 14 days and compared them with healthy control groups. We applied primary antibody to the samples and secondary antibody one day later. We observed Snail expression in the proximal tubules, distal tubules, and glomeruli in the renal cortex. Hemalaun-eosin staining and DAPI staining were also performed.

**Results:** The highest number of Snail positive cells was on day 11 in the distal tubules of the Dab1 knock-out mouse. The entry of Snail into the glomerular nucleus was also seen at day 11. The strongest signal of the cell of the proximal tubule, distal tubule and glomerulus Dab1<sup>-/-</sup> mouse samples show the 11th day. The 14th signal strength in the glomeruli decreases but in the proximal and distal tubule it remains the same. In the control group, the intensity of Snail staining increased on the 14th postnatal day in the proximal and distal tubules, while in the glomeruli it decreased.

**Conclusion:** Our results show a greater increase of Snail in the kidney of the knock-out mouse compared to the healthy control group. These results indicate that the Dab1 gene has a great ability in kidney development and its mutation potentially causes damage to the kidneys. Since the role of Snail in the kidneys of Dab1<sup>-/-</sup> mice has not yet been investigated, more research is needed.



## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Ivana Bulat

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 19. veljače 1995. godine, Split

Telefon: +385995969799

Elektronička pošta: [ivanabulat@hotmail.com](mailto:ivanabulat@hotmail.com)

## **OBRAZOVANJE**

- 2001.-2009. Osnovna škola Skalice, Split
- 2009.-2013. III Gimnazija, Split
- 2013.-2020. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Studij medicine

## **STRANI JEZICI**

- Engleski jezik – aktivno
- Talijanski jezik – pasivno