

# Uloga koneksina u međustaničnoj signalizaciji tijekom razvoja ljudskog bubrega i u bubrežnoj patologiji

---

**Kosović, Ivona**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*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:171:165919>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-08**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVONA KOSVIĆ, dr. med.**

**ULOGA KONEKSINA U MEĐUSTANIČNOJ SIGNALIZACIJI  
TIJEKOM RAZVOJA LJUDSKOG BUBREGA I U BUBREŽNOJ  
PATOLOGIJI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**IVONA KOSVIĆ, dr. med.**

**ULOGA KONEKSINA U MEĐUSTANIČNOJ SIGNALIZACIJI  
TIJEKOM RAZVOJA LJUDSKOG BUBREGA I U BUBREŽNOJ  
PATOLOGIJI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2021.**

## Zahvala

*Mojoj mentorici prof. dr. sc. Mirni Saragi-Babić na mentorstvu kakvog ne bih znala ni poželjeti. Hvala Vam na neiscrpnom vrelu savjeta, podrške, poduke i stručnosti. Sretna sam što sam dobila priliku raditi s Vama.*

*Mojim roditeljima koji su uz mene na svakoj stepenici mog puta, vaša podrška me uvijek potiče da idem naprijed.*

*Mojim kolegicama i kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, hvala na odličnoj suradnji i druženju uz spoznaju da će se sve na koncu riješiti.*

## Sadržaj

1. POPIS OZNAKA I KRATICA.....	1
2. UVOD.....	2
2.1 Bubreg.....	3
2.1.1 Anatomija i histološka građa bubrega.....	3
2.1.2 Funkcija bubrega.....	5
2.1.3 Razvoj bubrega.....	6
2.2 Koneksini.....	11
2.2.1 Koneksini u bubregu.....	13
2.3 Renin-angiotenzin-aldosteron sustav.....	14
2.3.1 Renin u razvoju bubrega.....	17
2.3.2 RAS u patološkim stanjima.....	18
2.3.3 Lokalizacija renina.....	19
2.4 Kalikrein-kinin sustav (KKS).....	19
2.5 Sinaptopodin i nefrin.....	20
2.6 $\alpha$ -SMA (eng. <i>alfa smooth actin</i> ) i CD31.....	21
2.7 Nefrotski sindrom Finskog tipa (CNF) i kronična bubrežna bolest (KBB).....	21
3. CILJEVI I HIPOTEZA.....	24
3.1 Ciljevi istraživanja.....	25
3.2 Hipoteza istraživanja.....	25
4. METODE I MATERIJALI.....	26
4.1 Biološki materijali.....	27
4.2 Metode.....	27
4.2.1 Priprema tkiva bubrega za histološku analizu.....	27
4.2.2 Hematoksilin-eozin bojanje.....	28
4.2.3 Imunofluorescencijsko bojanje.....	28
4.2.4 Elektronska mikroskopija.....	30
4.2.5 Analiza podataka.....	30
4.2.6 Semikvantitativna analiza.....	31
4.2.7 Statistički postupci.....	31
5. REZULTATI.....	32
5.1 Dvostruka imunofluorescencijska metoda za usporedbu izražaja različitih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) u prenatalnom i postnatalnom tkivu ljudskog bubrega te u bubrezima zahvaćenim CNF-om.....	33
5.1.1 Ko-ekspresija Cx43 i Cx45 u razvojnom i postnatalnom tkivu bubrega.....	33

5.1.2	Ko-ekspresija različitih koneksina s CD31 i $\alpha$ -SMA u razvojnim i postnatalnim bubrezima.....	35
5.1.3	Ko-ekspresija različitih koneksina s CD31 i $\alpha$ -SMA u CNF-u .....	38
5.1.4	Ko-ekspresija nefrina i sinaptopodina s različitim koneksinima u razvojnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim CNF-om .....	40
5.1.5	Ko-ekspresija različitih koneksina s markerima za proksimalne (DBA) i distalne zavijene kanaliće (LTL) u prenatalnim i postnatalnim bubrezima te bubrezima zahvaćenim CNF-om .....	41
5.2	Elektronska mikroskopija koneksina u razvojnim bubrezima i CNF-u .....	43
5.3	Kvantifikacija i semi-kvantifikacija izražaja koneksina tijekom razvoja ljudskog bubrega i u postnatalnom razdoblju .....	43
5.4	Dvostruka imunofluorescencijska metoda za usporedbu izražaja različitih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) i renina u JGA prenatalnog i postnatalnog tkiva ljudskog bubrega te u bubrezima zahvaćenim CNF-om.....	44
5.4.1	Izražaj Cx40 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega .....	44
5.4.2	Izražaj Cx43 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega .....	46
5.4.3	Izražaj Cx45 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega .....	47
5.4.4	Izražaj Cx37 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega .....	49
5.4.5	Ko-ekspresija renina i koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) u JGA .....	50
5.4.6	Izražaj renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega .....	50
5.4.7	Izražaj Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i renina u JGA u CNF-bubrezima.....	52
5.5	Polu-tanki rezovi i elektronska mikroskopija renina u zdravim postnatalnim bubrezima i CNF-u .....	53
5.6	Dvostruka imunofluorescencijska metoda za usporedbu izražaja renina i kalikreina u prenatalnom i postnatalnom tkivu ljudskog bubrega te u bubrezima zahvaćenim CNF-om	54
6.	RASPRAVA .....	57
6.1	Važnost pojedinih koneksina u razvoju nefrona zdravih bubrega, funkciji postnatalnih bubrega te u bubrezima s CNF-om.....	58
6.2	Važnost koneksina u razvoju JGA i kontroli arterijskog tlaka.....	61
7.	ZAKLJUČAK .....	64
8.	SAŽETAK .....	67
9.	SUMMARY .....	69
10.	LITERATURA .....	71
11.	ŽIVOTOPIS.....	80

## 1. POPIS OZNAKA I KRATICA

RAS	renin-angiotenzin-aldosteron sustav
KKS	kalikrein-kinin sustav
GBM	glomerularna bazalna membrana
GFR	glomerularna filtracija (eng. <i>glomerular filtration rate</i> )
ADH	antidiuretski hormon
PTH	paratiroidni hormon
MET	mezenhimsko-epitelna transformacija
EMT	epitelno-mezenhimska transformacija
NPC	eng. <i>nephron progenitor cell</i>
Cx	eng. <i>connexin</i>
ACE	eng. <i>angiotensin converting enzyme</i>
JG stanice	jukstaglomerularne stanice
JGA	jukstaglomerularni aparat
$\alpha$ -SMA	eng. <i>alfa smooth actin</i>
CNF	nefrotski sindrom Finskog tipa
KBB	kronična bubrežna bolest

## **2. UVOD**



## **2.1 Bubrezi**

Bubrezi su složeni parni organi koji su ključni za održavanje odgovarajućeg rada organizma. Primarna funkcija bubrega je u održavanju homeostaze regulacijom tekućina i elektrolita, kao i acido-baznog statusa. Ta funkcija se ostvaruje pravilnim transportom tekućine i elektrolita, izlučivanjem štetnih i reapsorpcijom hranjivih tvari, uz ostvarivanje normalnog pH nužnog za pravilan metabolizam stanica i tkiva (1). Bitna funkcija bubrega je sadržana i u regulaciji arterijskog tlaka preko mehanizama kao što su RAS (renin-angiotenzin-aldosteron sustav) i KKS (kalikrein-kinin sustav) (1). Brojni faktori tijekom ljudskog razvoja omogućavaju pravilan rad ovog složenog sustava svojom sinergističkom aktivnošću.

Renin je protein, ujedno i enzim, koji je ključan za održavanje normalnih vrijednosti krvnog tlaka, ali ima i važnu ulogu tijekom razvoja (2). Bubrežne stanice su međusobno povezane koneksinima, transmembranskim proteinima koji su jako bitni u prenatalnom razvoju kao i u postnatalnom periodu. Sudjeluju u autoregulaciji bubrega djelovanjem na prijenos međustaničnih signala kao i u koordinaciji funkcija u kojima sudjeluje veći broj stanica (3). I koneksini i renin su bjelančevine koje su, u suradnji sa susjednim stanicama, neophodne za funkcioniranje organizma u fiziološkom stanju, ali i u stanjima koja zahtijevaju popravak tkiva i njegovu regeneraciju. Poremećaji ovih bjelančevina pojavljuju se u patološkim stanjima, specifično, promjene u prostorno-vremenskom izražaju koneksina i renina pojavljuju se u abnormalnostima krvnih žila i u kroničnoj bubrežnoj bolesti (4, 5).

### **2.1.1 Anatomija i histološka građa bubrega**

Bubreg je parni organ koji se nalazi u retroperitoneumu, na stražnjem abdominalnom zidu. Bubreg ima gornji i donji pol te konveksnu lateralnu i konkavnu medijalnu stranu. Konkavni dio bubrega zove se hilus i to je mjesto gdje bubrežna arterija ulazi, a renalna vena izlazi iz parenhima bubrega, kao i mjesto gdje bubregu pristupaju živci i izlazi mokraćovod (6). Bubreg je okružen vezivnom čahuricom (kapsulom) ispod koje se nalazi parenhim bubrega koji se sastoji od kore i srži. Srž bubrega je podijeljena na bubrežne piramide kojih je u bubregu od 5-11 i koje se nastavljaju na male i potom velike bubrežne vrčeve. Veliki bubrežni vrčevi se udružuju u formiranje bubrežne nakapnice, koja se distalno nastavlja na mokraćovod (1). Sržni tračci su

vezivni tračci koji se protežu od osnove piramida u srži do kore i dijele bubrege na režnjeve (1, 7).

Svaki bubrege se sastoji od oko 1 milijun nefrona (1, 2). Nefron je osnovna funkcionalna jedinica bubrege. Postoje dvije vrste nefrona, kortikalni i jukstamedularni. Jukstamedularni nefroni su zastupljeni u manjoj mjeri, a nalaze se blizu kortikomedularne granice i imaju jako dugu Henleovu petlju (7). Sastavnice nefrona su bubrežno tjelešće, proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja te distalni zavijeni kanalić. Bubrežno tjelešće čine glomerul i Bowmanova čahura. Glomerul je klupko kapilara u koje krv dolazi dovodnom arteriolom, a izljuje se u odvodnu arteriolu. Dovodna arteriola je neizravni ogranak bubrežne arterije. Bubrežna arterija se grana na interlobarne arterije koje se nalaze između režnjeva bubrege, a daju ogranke za lučne (arkuatne) arterije na kortikomedularnoj granici. Interlobularne arterije se nastavljaju na lučne, nalaze se između režnjeva u kori bubrege, a granaju se na dovodne arteriole. Odvodne arteriole se granaju i čine peritubularnu kapilarnu mrežu koja opskrbljuje krvlju dijelove nefrona u kori (proksimalni i distalni zavijeni kanalić). Odvodne arteriole jukstamedularnih nefrona tvore još jednu mrežu krvnih žila koja opskrbljuje srž hranjivim tvarima i kisikom i zove se *vasa recta* (ravne žile). Tok vena slijedi tok arterija pa su te krvne žile istog naziva i veličine kao odgovarajuće arterije (8). Bowmanova čahura okružuje glomerul te se sastoji od dva lista, visceralnog i parijetalnog. Parijetalni list je građen od pločastih ili kubičnih stanica te je od visceralnog odvojen prostorom koji se zove mokraćni (interkapsularni) prostor, prostor u koji otječe glomerularni filtrat. Visceralni list obavlja kapilare glomerula te je građen od podocita (9, 10). Podociti su visoko specijalizirane stanice ključne za izgrađivanje selektivne propusnosti glomerularne filtracijske membrane (11). Imaju duge nožice koje su povezane *slit* membranom, oblikujući otvore veličine oko 40 nanometara (12). Ultrafiltracijska membrana se, osim podocita, sastoji još od endotelnih stanica i mezangijskih stanica. Mezangijske stanice imaju funkciju u potpori kapilarne mreže, tj. u stvaranju glomerularne bazalne membrane (GBM) te održavanju visokog kapilarnog tlaka bitnog za filtraciju. GBM nastaje stapanjem bazalnih lamina kapilara i podocita, a građena je od kolagena tipa IV, laminina, nidgena i heparan sulfat proteoglikana. GBM omogućava znatan protok vode i ograničava prolazak velikim molekulama (10).

Stanice proksimalnog zavijenog kanalića su izgrađene od kubičnog do cilindričnog epitela i imaju dobro razvijenu četkastu prevlaku građenu od površinskih izdanaka stanične membrane tj. mikrovila. Imaju acidofilnu citoplazmu jer sadržavaju brojne mitohondrije (13). Stanice distalnog kanalića su također građene od kubičnog epitela, ali bez mikrovila, dok njihova bazolateralna membrana ima brojna uvrnuća udružena s mitohondrijima (14).

Henleovu petlju tvore tanki i debeli segmenti. Debeli segmenti su građeni od jednoslojnog kubičnog epitela te im stanice imaju eozinofilnu citoplazmu. Epitel tankih dijelova je jednoslojni pločasti (7).

Sabirne cjevčice i cijevi su građene od dva tipa stanica, svijetlih (glavnih) i tamnih (interkalarnih) stanica. Glavne stanice imaju po jednu nepokretnu ciliju na apikalnoj površini koja služi kao senzor za sastav tekućine koja protječe kroz kanalić te imaju receptor za aldosteron, dok tamne stanice imaju mnoštvo mikrovila i veliki broj mitohondrija. Jedan dio sabirnih cjevčica prolazi i kroz koru gdje se u njihovoj građi vidi znatnije veći broj tamnih stanica. Glavne stanice su poligonalnog oblika dok su tamne stanice okruglog oblika (7, 15).

### 2.1.2 Funkcija bubrega

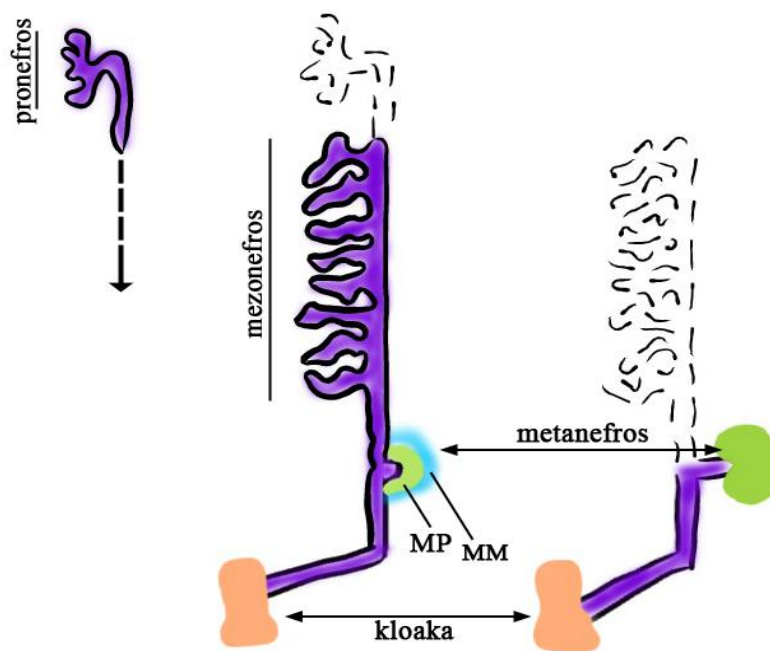
Glavne funkcije bubrega su glomerularna filtracija, tubularna reapsorpcija i sekrecija. Stvaranje filtrata se događa na području ultrafiltracijske membrane, a protok tekućine i tvari ovisi o razlikama između hidrostatskog tlaka u glomerulu te onkotskog tlaka i hidrostatskog tlaka u interkapsularnom prostoru. Protok krvi kroz bubrege podliježe autoregulaciji koja štiti glomerularne kapilare od visokog arterijskog tlaka kao i velikih promjena u koncentracijama elektrolita. Povećanje tlaka uzrokuje suženje (konstrikciju) dovodne arteriole što smanjuje hidrostatski tlak u glomerulima. Sastav glomerularnog filtrata je sličan sastavu krvne plazme, ali u fiziološkom stanju ne sadržava bjelančevine i krvne stanice, jer su preveliki za prolazak kroz ovu barijeru. Glomerularna filtracija (GFR, eng. *glomerular filtration rate*) je mjera za količinu krvi koju bubrezi filtriraju u minuti. Uobičajena glomerularna filtracija je oko 125 mL u minuti što odgovara količini od oko 180 litara dnevno. Oko 99% filtrata se u bubregu reapsorbira, a samo oko 1-2 L se izlučuje kao mokraća. Nakon glomerularne filtracije, slijedi reapsorpcija i sekrecija vode i ostalih sastojaka filtrata kao što su natrij, kalcij, kalij, magnezij, fosfati, bikarbonati, kloridi, glukoza, aminokiseline, urea i kreatinin. Reapsorpcija i sekrecija se događaju aktivnim i pasivnim transportom. Aktivni transport zahtijeva energiju za prijenos tvari koje se kreću suprotno od svog elektrokemijskog gradijenta, dok pasivnim transportom tvari (bez potrebe za dodatnom energijom) prelaze iz mjesta veće prema mjestu manje koncentracije. Najviše tvari se reapsorbira u proksimalnim zavijenim kanalićima (1). Elektroliti i tvari poput soli, vode, kalija, kalcija, fosfata, bikarbonata, aminokiselina, glukoze i vitamina vraćaju se u cirkulaciju putem peritubularnih kapilara i vasa recta. Održavanje konstantne

osmolalnosti krvne plazme kao i optimalne koncentracije natrija je od esencijalne važnosti za održavanje homeostaze. U tome važnu funkciju ima Henleova petlja, dok distalni zavijeni kanalići imaju važnu ulogu u održavanju koncentracije natrija, kalija i drugih kationa. U sabirnim cjevčicama i cijevima također dolazi do reapsorpcije soli i sekrecije kalija (8, 15). Reapsorpcija i sekrecija vode i sastavnica filtrata je regulirana pomoću nekoliko mehanizama. Jedan od njih je utjecaj antidiuretskog hormona (ADH), koji se izlučuje u stražnjem režnju hipofize, na reapsorpciju vode u distalnim kanalićima i sabirnim cijevima povećanjem propusnosti tubula. Također, iznimno je bitno djelovanje aldosterona na reapsorpciju natrija i izlučivanje kalija i vodika, prvenstveno u distalnom kanaliću. Ti mehanizmi ujedno imaju i važnu ulogu u kontroli arterijskog krvnog tlaka (1).

Bubrezi također sudjeluju u održavanju normalnog pH izlučivanjem ili reapsorpcijom vodikovih iona i bikarbonata. Bubrezi imaju ulogu i u regulaciji koncentracija kalcija i fosfata u krvi pod utjecajem paratiroidnog hormona (PTH). Osim toga, vitamin D, koji je bitan za apsorpciju kalcija i fosfata u tankom crijevu, u bubrezima prelazi u aktivni oblik. Još jedna od brojnih funkcija ovog složenog organa je sudjelovanje u stvaranju eritrocita (eritropoezi) proizvodnjom hormona eritropoetina koji potiče koštanu srž na sazrijevanje i izlučivanje eritrocita (1, 12).

### **2.1.3 Razvoj bubrega**

Tijekom razvoja ljudskog ploda nastaju tri djelomično preklapajuća bubrežna sustava: pronefros, mezonefros i metanefros (16) (Slika 1). Sve tri generacije bubrega potječu od intermedijarnog mezoderma koji nastaje tijekom gastrulacije (17).



**Slika 1.** Shematski prikaz 3 generacije bubrega: pronefros, mezonefros i metanefros. Legenda: MP (mokraćovodni pupoljak), MM (metanefrogeni mezenhim).

Pronefros se počinje razvijati u vratnom području početkom četvrtog tjedna, to je predbubreg koji se sastoji od 6-10 parova bubrežnih kanalića, čiji se proksimalni krajevi otvaraju u celom, a distalni u kloaku. Uz kanaliće pronefrosa, dolazi do zgušnjavanja intermedijarnog mezoderma i stvaranja nefunkcionalnih nefrona. Pronefros nije funkcionalan bubreg te regredira potkraj četvrtog tjedna. Međutim, bitna uloga pronefrosa je indukcija razvoja kanala mezonefrosa (Wolffov kanal) (18).

Mezonefros se razvija u torakolumbalnom području, dakle od gornjih prsnih do gornjih slabinskih segmenata u kranio-kaudalnom smjeru. Tijekom razvoja mezonefrosa dolazi do razvoja i prvih nefrona, a svaki glomerul nefrona je kanalićem povezan sa Wolffovim kanalom (19). Dolazi do stvaranja oko 40 parova primitivnih nefrona (mezonefroni), međutim samo oni lokalizirani između L1 i L3 se razvijaju u funkcionalne ekskretorne jedinice. Preciznije, 20 nefrona proizvodi male količine tekućine koja se otpušta u amnionsku tekućinu između šestog i desetog tjedna razvoja, no ti nefroni nemaju Henleovu petlju (19, 20). Tijekom razvoja nefrona mezonefrosa prvo nastaje bubrežni mjehurić koji se razvija u S-oblik nefrona. Lateralni

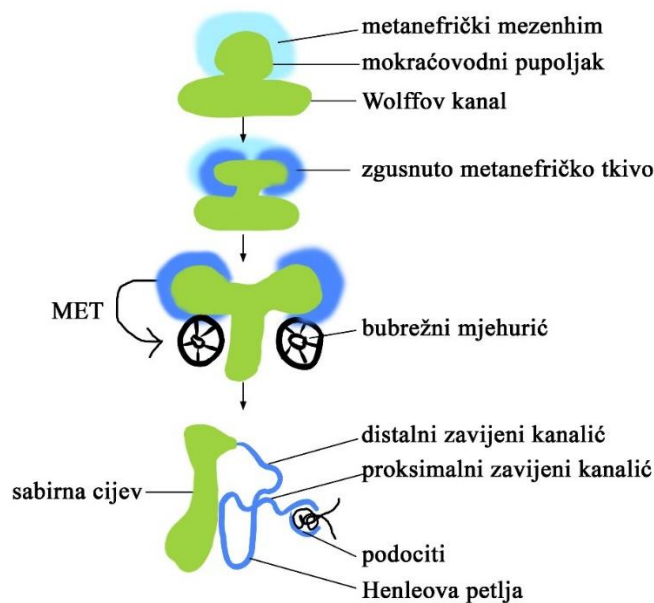
krajevi nefrona (S-oblik) pristupaju primarnom mokraćovodu, tj. Wolffovom kanalu, a medijalni dijelovi oblikuju Bowmanovu čahuru (21).

Kanal mezonefrosa kod žena iščezava od osmog do šesnaestog razvojnog tjedna (22), međutim kod muškaraca donji kanalići mezonefrosa i Wolffov kanal perzistiraju i sudjeluju u razvoju spolnih organa (23).

Metanefros je definitivni ili konačni bubreg i razvija se u sakralnom dijelu tijela. Morfološki i razvojno, mezonefros i metanefros imaju dosta sličnosti, no jedna od razlika je da u mezonefrosu kanalići nastaju uz Wolffov kanal, dok su u metanefrosu raspoređeni oko mokraćovodnog pupoljka (23). Smatra se da razvoj metanefrosa ima četiri glavna razdoblja. Prvo je razdoblje rasta i intenzivnog grananja mokraćovodnog pupoljka te induciranje nefrona, a to se postupno smanjuje tijekom drugog i trećeg razdoblja, da bi indukcija nefrona prestala tijekom završnog razdoblja kada dolazi do završetka nefrogeneze (16).

Razvoj metanefrosa započinje u petom tjednu i u početku ko-egzistira s mezonefrosom (19). Kanal mezonefrosa se izdužuje i na svom kaudalnom kraju otvara u kloaku te inducira intermedijarni mezoderm u sakralnom dijelu tijela na zgušnjavanje i stvaranje metanefrogenog tkiva (blastema). Metanefrogeni blastem inducira razvoj mokraćovodnog pupoljka iz kanala mezonefrosa. Za pravilnu diferencijaciju bubrega potrebna je izrazito složena interakcija mezenhima i epitela (24). Mnogi signali bitni za to međudjelovanje su na molekularnoj razini. Tako npr. GDNF, neurturin, persephin, HGF, BMP-2, BMP-7, FGF-10, activin i TGF $\beta$  kontroliraju razvoj mokraćovodnog pupoljka, dok TGF $\alpha$ , TIMP-2, BMP-4 i BMP7 kontroliraju razvoj mezenhima. LIF, FGF-2, TGF $\beta$ , Wnt-4, sFrp, Notch i Jagged kontroliraju razvoj nefrona, a VEGF kontrolira nastanak krvnih žila (vaskularizaciju) (10, 20, 22, 25). Iz mokraćovodnog pupoljka se razvijaju sabirni kanalići i cijevi, veliki i mali vrčevi, nakapnica i mokraćovodi, dok od metanefrogenog mezenhima nastaju glomeruli i dijelovi nefrona (26) (Slika 2). U šestom tjednu počinje grananje mokraćovodnog pupoljka iz kojeg se razvija odvodni sustav bubrega. Razvoj nefrona započinje zgušnjavanjem metanefrogenog tkiva u kapu metanefrogenog tkiva. Zbog indukcijskog djelovanja vrhova odvodnih kanalića (sabirnih cijevi) stvara se bubrežni mjehurić. Stvaranje bubrežnog mjehurića je završni korak mezenhimsko-epitelne transformacije, kojoj je svojstveno stvaranje međustaničnih spojeva, promjene u ekspresiji različitih bjelančevina i intermedijarnih filamenata te pojava apiko-bazalne polarnosti stanica nefrona (16). Bubrežni mjehurić izduživanjem prelazi u oblik zarez a te potom S-oblik. Proksimalni kraj S-oblika se razvija u Bowmanovu čahuru na koju se nastavlja proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja te distalni zavijeni kanalić. Na

distalnom kraju S-oblika distalni zavijeni kanalići se povezuju sa sabirnim kanalićima kako bi omogućili pravilno otjecanje mokraće.



**Slika 2.** Shematski prikaz razvoja metanefrosa.

Podociti potiču od metanefrogenog mezenhima i u svom razvoju prolaze i kroz proces mezenhimsko-epitelne transformacije (MET) tijekom stadija S-oblika nefrona. Međutim, karakteristično je za podocite da prolaze i obrnuti proces tzv. epitelno-mezenhimske transformacije (EMT) u kasnijim stadijima glomerulogeneze, a tom je procesu svojstvena transformacija cilindričnih epitelnih stanica u stanice mezenhimalnog tipa (27, 28).

Razvoj glomerularnog klupka počinje kada prekursori podocita (bez nožica i filtracijske pukotine) u S-obliku počinju izlučivati VEGF, što privlači endotelne stanice na nakupljanje u primitivno kapilarno klupko. Tako nastaje dovodna arteriola koja se sustavom arterija poveže s renalnom arterijom, te eferentna arteriola iz koje krv ide u distalne dijelove nefrona te potom u venule. Kontakt između prekursora podocita i endotelnih stanica potiče diferencijaciju podocita, što dovodi do nastanka GBM (10, 20, 25). Oblikovanje glomerula ovisi i o mezangijskim stanicama, koje su bitne i za izgradnju i očuvanje GBM. Stadij kapilarne petlje je prototip funkcionalne glomerularne strukture i u tom stadiju je glomerularno klupko segmentirano u 5-8 režnjeva u kojima dolazi do razvoja novih kapilara. U tom stadiju dolazi do povećanje podocita, kao i njihovih nožica, kako bi se povećala filtracijska površina. Laminin a1 i b1 te kolagen tip IV a1 i a2 su glavni dijelovi GBM, a proizvode ih i podociti i endotelne

stanice. U kasnijim stadijima, te komponente GBM sazrijevaju i razvijaju se u naprednije oblike (10).

Metanefros (definitivni bubreg) se dakle razvija iz tri stanične linije koje čine epitelne stanice, mezenhimske stanice te endotelne stanice. Tijekom razvoja bubrega vrlo je bitna interakcija mezenhimske i epitelne stanične komponente, točnije epitela mokraćovodnog pupoljka i mezenhima metanefrogenog tkiva što se zove mezenhimsko-epitelna transformacija (MET) (29). Sve epitelne stanice koje izgrađuju nefron potječu od iste multipotentne progenitorske stanice nefrona (NPC) koja se nalazi u metanefrogenoj kapi, dok stanice mokraćovodnog pupoljka potječu iz prednjeg dijela intermedijarnog mezoderma (30). Metanefrogeni mezenhim potječe od stanica primitivne pruge koje postaju stanice stražnjeg intermedijarnog mezoderma (31, 32). Nakon zgsnuća metanefrogenog tkiva dolazi do promjene u izgledu mezenhimskih stanica, koje se izdužuju te im se povećava kontaktna površina. Prvi znak apiko-bazalne polarizacije nastaje u bubrežnom mjehuriću. Prvi znak vaskularizacije je stvaranje pukotine u S-obliku nefrona gdje potom dolazi do stvaranja glomerularnog klupka od endotelnih stanica (12, 33).

Primitivni glomerul razvija se oko 9.-10.-og tjedna intrauterinog života, a iako neki autori navode da nefrogeneza završava u 34.-36.-om tjednu gestacije, postoje naznake da traje i u ranom postnatalnom periodu. Tijekom razvoja ljudskog bubrega nastaje oko 1 milijun nefrona iz progenitorskih stanica (5, 34, 35, 36, 37). Poslije rođenja također dolazi do određenih promjena, kao što su daljnji porast veličine nefrona i njihovo funkcionalno sazrijevanje (38).

Uloga metanefrosa tijekom razvoja je većinom stvaranje velike količine urina za osiguravanje adekvatne količine amnionske tekućine (19). Između šestog i devetog tjedna razvoja bubrezi se, uslijed povećanja abdominalne šupljine te fleksije i ekstenzije tijela, povlače iz sakralnog dijela embrija u lumbalno područje (39, 40). Metanefros postaje funkcionalan oko desetog tjedna intrauterinog razvoja kad počinje proizvodnja mokraće (38). Primarna funkcija nefrona nakon rođenja je filtriranje krvi, praćeno apsorpcijom, reapsorpcijom ili sekrecijom vode i elektrolita te stvaranjem urina (30).



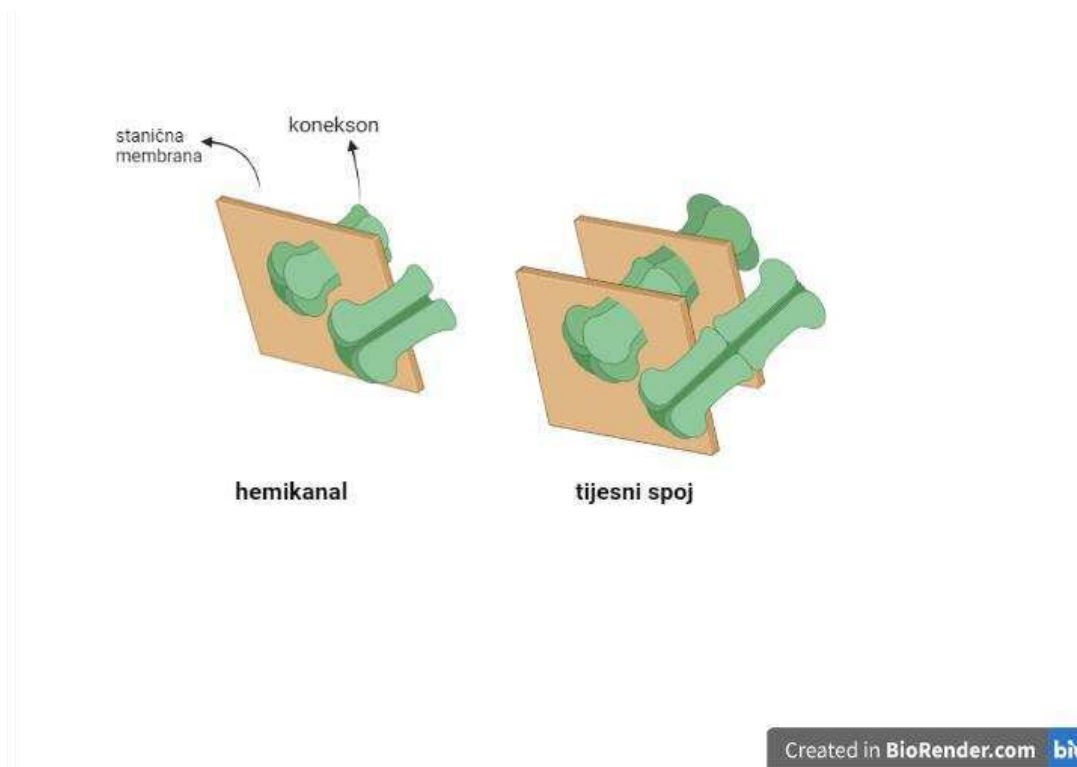
## 2.2 Koneksini

Koneksini su transmembranske bjelančevine koji imaju važnu ulogu u staničnoj komunikaciji i prisutni su u svim tkivima osim diferenciranog skeletnog mišića, eritrocita i zrelih spermija (41-43).

U ljudskom genomu postoji 21 gen za koneksine, dok ih u genomu miša ima 20 (41, 44, 45). Nazivi gena koji kodiraju te bjelančevine počinju sa slovima "GJ" (eng. *gap junction*). Skraćeni nazivi bjelančevina koneksina se sastoje od slova "Cx" (eng. *connexin*) te broja koji odgovara molekularnoj masi pojedine bjelančevine u kilodaltonima (46). S obzirom na sličnost u strukturi i sekvenci gena te dužini citoplazmatske domene, koneksini se dijele na 5 podobitelji: GJA, GJB, GJC, GJD I GJE (46, 47).

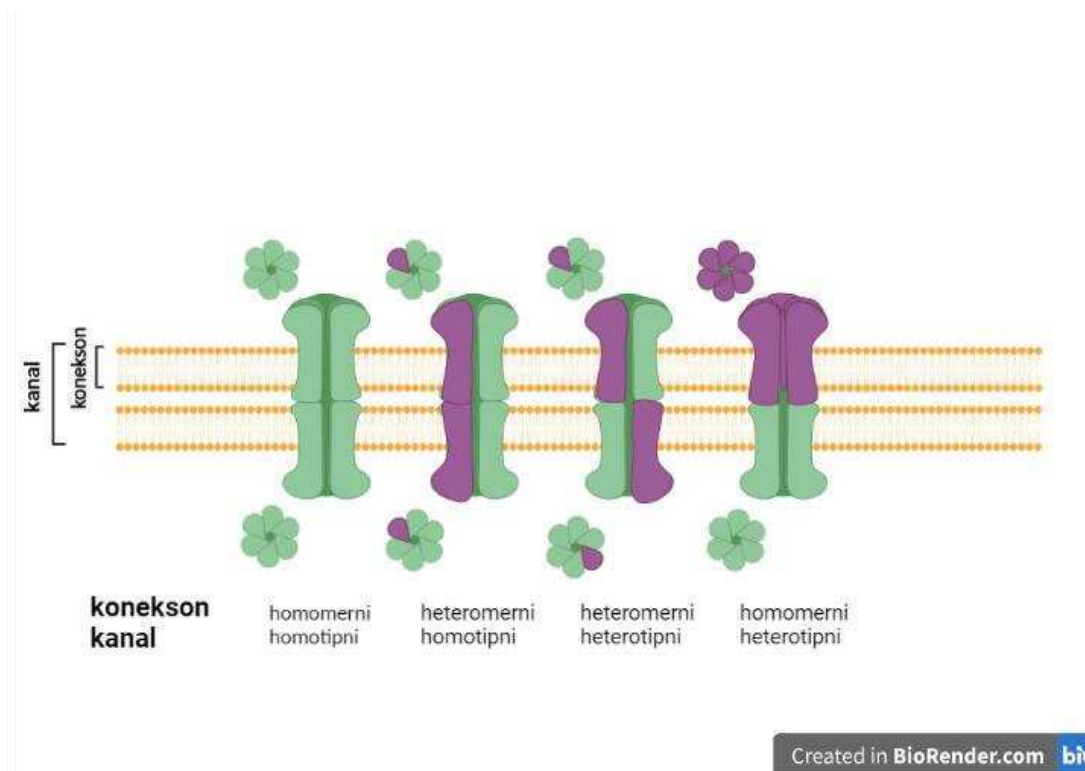
Koneksin se sastoji od 4  $\alpha$ -spiralne transmembranske domene (TM1-TM4), dvije izvanstanične petlje (EL1 i EL2), citoplazmatske petlje (CL) između TM2 i TM3 i citoplazmatske amino-terminalne (NT) i karboksi-terminalne (CT) domene (43, 46). Izvanstanični dijelovi su odgovorni za interakciju sa susjednim stanicama ili staničnim okolišem, dok unutarstanične domene (koje imaju COOH i NH<sub>2</sub> kraj) sudjeluju u posttranslacijskim modifikacijama koje kontroliraju aktivnost kanala (3).

Koneksini se sintetiziraju u endoplazmatskoj mrežici i oligomeriziraju u Golgijevom aparatu kako bi mogli tvoriti konekson, skupinu od 6 koneksina sa središnjom porom (41, 43, 48). Koneksini mogu tvoriti hemikanale i tijesne spojeve (49, 50) (Slika 3). Hemikanali su prisutni na jednoj stanici i odgovorni su za komunikaciju između citoplazme i izvanstaničnog matriksa. Postoje dva tipa hemikanala: homomerni, koji se sastoje samo od jednog tipa koneksina i heteromerni, koji se sastoje od dva ili više tipova koneksina. Smatra se kako su hemikanali uglavnom aktivirani patološkim podražajem, kao što su reperfuzijske ozljede i oksidativni stres, dakle procesi stanične smrti i upale, a zbog toga se još nazivaju i "patološke pore" (51, 52). Također su odgovorni za autokrino i parakrino signaliziranje (47). Hemikanali osiguravaju prijenos iona i malih metabolita kao što su ATP, cAMP, IP<sub>3</sub> i glutamat, a izrazito su osjetljivi na promjene u koncentraciji Ca<sup>2+</sup> kao i na transmembransku voltažu, točnije produženu depolarizaciju membrane (43).



**Slika 3.** Shematski prikaz hemikanala i tijesnog spoja.

Drugi tip komunikacije koja se ostvaruje koneksinima je komunikacija između dvije stanice u kojoj sudjeluju dva koneksiona – tijesni spoj. Takva struktura može biti homotipna, kada su koneksioni identični ili heterotipna, kada su susjedni koneksioni građeni od nekoliko tipova koneksina. Sami koneksioni, kao i hemikanali, mogu biti homomerni ili heteromerni (41, 42, 53) (Slika 4). Tijesni spojevi su kompleksi koji omogućavaju direktnu izmjenu malih hidrofilnih molekula i iona između susjednih stanica (48, 49). Kroz tijesne spojeve prolaze molekule manje od 1kDa (41, 54), poput aminokiselina, malih peptida, CAMP, inositol trifosfata, šećera, iona kao što su  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  i  $Ca^{2+}$  (46, 54). Tijesnim spojevima svojstvena je propusnost za veće molekule i provodljivost za male ione. Važno je naglasiti da te dvije karakteristike nužno ne koreliraju. Ukupna provodljivost između dvije stanice ovisi o broju tijesnih spojeva, činjenici jesu li otvoreni ili ne, te provodljivosti svakog pojedinog kanala (43). Obje vrste komunikacijskog spoja imaju važnu ulogu u raznim fiziološkim i patološkim procesima (43, 51, 52, 55, 56). Esencijalni su za održavanje homeostaze (48), kao i za brojne druge fiziološke funkcije kao što su stanični rast i diferencijacija (3, 57, 58), stanično preživljavanje i stanična smrt (54, 59, 60), razvoj krvnih žila (angiogeneza) i razvoj matičnih stanica (47). Koneksini su široko rasprostranjeni i u krvnim žilama gdje služe za kontrolu njihove pokretljivosti (vazomocije) (61).



**Slika 4.** Shematski prikaz tipova koneksiona i tjesnih spojeva.

Novije studije navode prisutnost Cx43 u obliku međustanične komunikacije između udaljenih stanica, kao što su TNT (eng. *tunnelling nanotubes*) i izvanstanične vezikule (58, 62).

Ekspresija pojedinih koneksina je visoko specifična za pojedine stanice i tkiva, a promjene u koneksinima te posljedično u tijesnim spojevima dovode do raznih patoloških zbivanja, što je opisano kod ljudi i eksperimentalnih životinja (54, 58, 63).

Promjene u ekspresiji koneksina se javljaju u raznim patološkim promjenama krvnih žila (64-66). Studije koje su bile fokusirane na Cx45 pokazale su da je izostanak ovog koneksina letalan za miševu u razvoju jer ne dolazi do adekvatnog formiranja krvnih žila (53, 67), dok je porast ovog proteina povezan s razvojem hipertenzije (68).

### 2.2.1 Koneksini u bubregu

U bubrezima je dokazana ekspresija 9 tipova koneksina: Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i Cx46 (11, 69). Ekspresija ovih koneksina opisuje se u raznim dijelovima nefrona, ali za sada je samo u proksimalnim kanalićima dokazana prisutnost tijesnih spojeva (69). Studija o Cx37 opisuje lokalizaciju ovog proteina, ali ima jači izražaj u distalnim

dijelovima nefrona nego u proksimalnim (70). Izražaj Cx45 je također opisan u distalnim dijelovima nefrona kod miša (71).

U bubrežnim krvnim žilama i jukstaglomerularnom aparatu (JGA) izraženi su Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 što govori o njihovoj važnoj ulozi u regulaciji tlaka (69, 72). Smatra se da neki od ovih koneksina imaju ulogu u otpuštanju renina, kao što je Cx37 (73), ali osobito Cx40 koji je dominantni koneksin u stanicama koje proizvode renin, te je bitan za otpuštanje renina koje u velikoj mjeri dovodi do hipertenzije (5, 72, 74-76).

Eksperimentalne studije su pokazale da je u endotelnim stanicama izražena ekspresija Cx37, Cx40 i Cx43 (69, 77-79), u glatkim mišićnim stanicama se javljaju Cx43 i Cx45, dok su u stanicama koje proizvode renin izraženi Cx37, Cx40 i Cx45, ali ti rezultati variraju u različitim studijama (3, 55, 64, 69, 80). U mezangijskim stanicama su izraženi Cx37, Cx40 i Cx43 (79, 81). Cx40 pokazuje ekspresiju u glomerularnim i ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama, dok studije o Cx37 i Cx43 u tim stanicama pokazuju oprečne rezultate (74, 78, 82, 83). Smatra se da se u spojevima između podocita nalazi primarno Cx43 (11).

Istraživanja o ekspresiji koneksina u bubregu većinom su rađena na eksperimentalnim životinjama postnatalno, dok su razvojne studije znatno rjeđe. U studiji Butterwecka i suradnika navodi se sniženje koncentracije Cx45 kod postnatalnog miša, u odnosu na koncentraciju Cx45 u embrionalnom razvoju bubrega. Koristeći RT-PCR metodu, Silverstein i sur. dokazuju prisutnost Cx37, Cx45 i Cx46 u ranom razvoju bubrega kod štakora (71, 84).

Studije o ekspresiji koneksina u ljudskim bubrezima izvan zida krvnih žila su također vrlo rijetke, a osobito malo studija je na fetalnim uzorcima. U studiji Hiede i sur., Cx43 je uočen samo u tubulima kore bubrega, dok nije pokazao izražaj ni u bubrežnim krvnim žilama niti u mezangijskim stanicama. Radulyjeva studija navodi drukčije rezultate, jer se Cx43 opisuje u endotelu glomerula i peritubularnih krvnih žila te u proksimalnim kanalićima (85, 86).

### **2.3 Renin-angiotenzin-aldosteron sustav**

Renin je bjelančevina koja se sintetizira prvo kao preprorenin u jukstaglomerularnim endotelnim stanicama te se potom cijepa na prorenin, inaktivni prekursor renina. Prorenin se može aktivirati proteolitičkom aktivnošću u bubregu (neuroendokrini konvertaza 1 ili katepsin B) ili ne-proteolitičkom aktivnošću u brojnim tkivima vezivanjem na renin/prorenin receptor.

Renin se skladišti u zrnatim (granularnim) stanicama, a zrnca renina se otpuštaju po potrebi, ovisno o djelovanju renin-angiotenzin-aldosteron sustava. U svojoj aktivnoj formi ima 340 aminokiselina i ima više izoformi. Smatra se i hormonom zbog njegove uloge u staničnoj signalizaciji (2, 5, 87).

Angiotenzinogen spada u obitelj serpin proteina (SERPINA) i proizvodi se u jetri u velikim količinama. Koncentracije angiotenzinogena u plazmi se povećavaju pod utjecajem kortikosteroida, estrogena, hormona štitnjače i razina angiotenzina II (1, 2). U cirkulaciji, renin metabolizira angiotenzinogen tako što djeluje na vezu između leucina i valina čime on prelazi u angiotenzin I. ACE (eng. *angiotensin converting enzyme*) u plućnim kapilarama, endotelnim stanicama i bubrežnim epitelnim stanicama pretvara AngI u AngII. Angiotenzin II je svestrana molekula koja ima i autokrinu i parakrinu ulogu te utječe na nekoliko sustava u tijelu. Angiotenzin II djeluje na dvije vrste receptora, AT1R i AT2R koji djeluju na oprečan način. Vezivanje angiotenzina II na AT1R receptor rezultira povećanim zadržavanjem soli, vazokonstrikcijom (uključujući i konstrikciju eferentne arteriole), stimulacijom žeđi i željom za soli, povećanom simpatičkom aktivnošću te otpuštanjem aldosterona iz zone glomeruloze nadbubrežne žlijezde. Mnoge bolesti povezane s kroničnom RAS aktivnošću se događaju zbog promjena ovog receptora. Aktivacija receptora AT2R rezultira suprotnim učinkom, stimulacija AT2R dovodi do antiupalne reakcije te vazodilatacije. AT2R receptor je dominantan receptor tijekom fetalnog razvoja i ima važnu ulogu u razvoju, dok se kod odraslih ljudi može pojačano aktivirati u nekim patološkim stanjima. Angiotenzin II ima ulogu u rastu i diferencijaciji bubrega, nadbubrežne žlijezde, srca i jetara, organa bitnih za regulaciju krvnog tlaka u postnatalnom životu (2, 87-89). Aldosteron se veže na mineralokortikoidni receptor u bubrežima te regulira reapsorpciju natrija povećanjem izražaja epitelnih natrijevih kanala (ENaC) (90). Ova enzimska kaskada ovisi o kontroliranoj regulaciji izlučivanja renina iz jukstaglomerularnih (JG) stanica.

Jukstaglomerularne stanice su locirane u jukstaglomerularnom aparatu. Jukstaglomerularni aparat je građen od dovodne i odvodne arteriole, *maculae densae* i ekstraglomerularnog mezangija (Slika 5). Jukstaglomerularni aparat ima dvije bitne regulatorne funkcije, vazokonstrikciju dovodne arteriole potaknutu visokim koncentracijama NaCl-a i oslobađanje renina inducirano niskim koncentracijama NaCl-a. *Macula densa* se sastoji od 15 do 20 stanica lokaliziranih u distalnom kanaliću, nakon završnog dijela debelog uzlaznog kraka Henleove petlje. Ima karakterističan smještaj u JGA, apikalna membrana je izložena tekućini u kanaliću, a bazalna strana je u kontaktu s mezangijskim stanicama i dovodnom arteriolom. Funkcija ove strukture leži u detektiranju promjena u tekućini kanalića i slanju signala ostatku

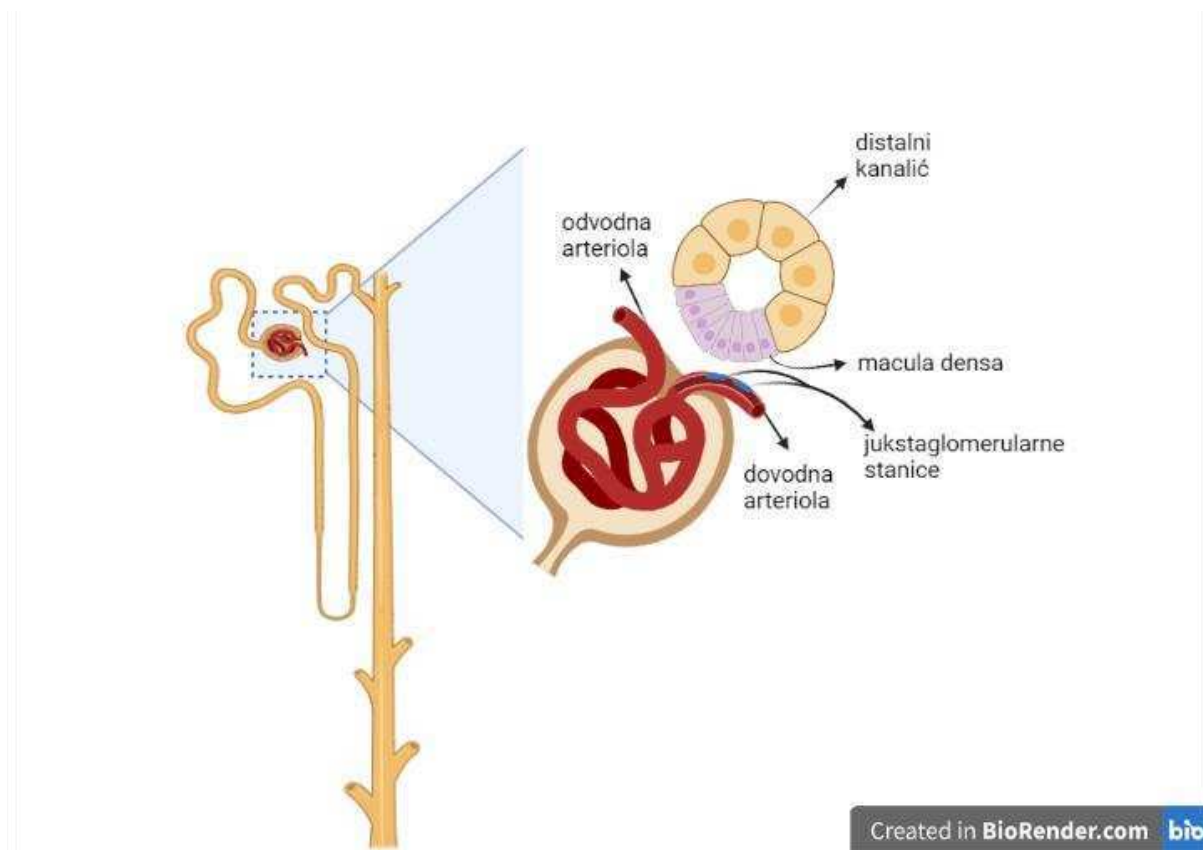
jukstaglomerularnog aparata kako bi se omogućila pravilna kontrola glomerularnog filtrata (91, 92). JG stanice nalaze se u dovodnoj arterioli na ulazu u glomerul i u tom području su u bliskoj vezi sa stanicama *maculae densae* i ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama (93, 94). JG stanice su mioepitelnog tipa i pod simpatičkom su inervacijom. Postoje tri mehanizma koji kontroliraju otpuštanje renina:

1) baroreceptorski mehanizam koji potiče izlučivanje renina u stanjima sniženog perfuzijskog tlaka kao što su hipotenzija, šok, hemoragija i srčano zatajenje

2) mehanizam *maculae densae* koji registrira promjene u koncentraciji NaCl-a u distalnom kanaliću

3) mehanizam posredovan beta-receptorom čija stimulacija potiče lučenje renina u stanjima kao što je hipoksija. Ta tri mehanizma u fiziološkim uvjetima funkcioniraju zajedno. Angiotenzin II utječe na izlučivanje renina negativnom povratnom spregom. Na sintezu renina još utječu i razina atrijskog natriuretskog peptida, endotelin, prostaglandini, dušikov oksid (NO) i koncentracija kalcija u JG stanicama. S obzirom da kalcij obično potiče egzocitozu u drugim stanicama i tkivima, inhibitorni učinak kalcija na sekreciju renina se zove „kalcijev paradoks izlučivanja renina“ (1, 5, 91, 95). Bitno je za spomenuti da koneksini prenose kalcij koji je odgovoran za ovaj tip regulacije renina (3).

Postoji nekoliko tipova stanica u jukstaglomerularnom aparatu: glatke mišićne stanice krvnih žila, endotelne stanice, mezangijske stanice, stanice *maculae densae* i jukstaglomerularne zrnate stanice koje proizvode renin (3, 96). Ove stanice, uz izuzetak stanica *maculae densae*, povezane su tijesnim spojevima koji omogućavaju njihovo koordinirano djelovanje (3). Jukstaglomerularno područje nije jedino područje gdje se mogu pronaći stanice koje proizvode renin. Reninske stanice se javljaju vrlo rano u embrionalnom razvoju te se mogu pronaći u mnogim embrionalnim tkivima kao što su koža, živčani sustav, koštana srž, gušterača, jetra i brojni drugi. Tek se kasnije lokaliziraju u bubrezima, a tijekom samog razvoja bubrega te stanice prolaze put od široke rasprostranjenosti u cijelom tkivu bubrega do lokalizacije u jukstaglomerularnom aparatu (5).



**Slika 5.** Jukstaglomerularni aparat.

### 2.3.1 Renin u razvoju bubrega

Tijekom intrauterinog života RAS ima nekoliko važnih funkcija: doprinosi održavanju perfuzijskog tlaka, a izrazito je bitan i zato što angiotenzin II, kao potentan faktor rasta, ima ulogu u kontroli nefrogeneze. Simpatikus uzrokuje povećanje tonusa krvnih žila u dovodnoj i odvodnoj arterioli što rezultira stimulacijom  $\alpha_2$  receptora i suprimiranjem  $\beta_2$  receptora. Fetalne bubrežne krvne žile osjetljivije su na stimulaciju  $\alpha_2$  receptora od krvnih žila nakon rođenja (34).

Studija na ljudskim razvojnim bubrezima je pokazala da su u 4-5 tjednu razvoja već izražene sve komponente RAS-a (88).

Foxd1 prekursori se diferenciraju u reninske prekursorske stanice, a one se pretvaraju u mezangijske stanice, stanice glatkog mišića i intersticijske pericite. Nedavne studije pokazuju moguću ulogu pericita u sintezi i skladištenju renina (97, 98). Prekursorske stanice renina direktno doprinose grananju arteriola u bubregu. Prilikom grananja arteriola, grupa reninskih stanica nalazi se u područje njihovog budućeg širenja. Tijekom razvoja dolazi do promjene u

raspodjeli renina (5, 99). Tijekom ranog razvoja, stanice koje proizvode renin se javljaju u raznim tkivima i sudjeluju u razvoju krvnih žila, ali i u regeneraciji tkiva (5, 100). Postepeno se reninske stanice pozicioniraju u bubrežnim žilama gdje imaju ulogu u njihovom razvoju, no naposljetku dolazi do ograničavanja njihove ekspresije na jukstaglomerularno područje (5, 93, 94, 100).

Pippin i Starke su pokazali da reninske stanice iz JGA sudjeluju u regeneraciji podocita i mezangijskih stanica. Naime, nakon ozljede podocita stanice reninske loze grupiraju se u području Bowmanove čahure i smatra se da dolazi do konverzije ili trans-diferencijacije iz jednog u drugi tip stanica. Slično je pokazano i za mezangijske stanice, s tim da te studije sugeriraju da reninske stanice trebaju migrirati kako bi došlo do dediferencijacije (5, 101, 102). Tijesni spojevi povezuju međusobno mezangijske stanice, stanice glatkog mišića, endotelne stanice i stanice koje izlučuju renin i omogućavaju im međusobnu komunikaciju (3, 69). Dakle u patološkim stanjima, reninske stanice se reprogramiraju u svoje prethodne razvojne stadije te imaju mogućnost diferencijacije u susjedne stanice (5, 97).

### **2.3.2 RAS u patološkim stanjima**

Tkivni RAS osim što je uključen u brojne fiziološke procese (103, 104), ima ulogu i u stanjima poremećene homeostaze kao što su upala, tromboza, ali i hipertenzija i bubrežne bolesti (5, 39, 88, 92, 105).

Renin je kodiran genom REN, a mutacije tog gena dovode do različitih patoloških stanja kao što su hiperuricemija, anemija i kronično zatajenje bubrega. Reninske progenitorske stanice imaju sposobnost uključivanja ili isključivanja reninskog gena u stadijima ugrožene homeostaze. Na taj način organizam održava optimalno okruženje i tkivnu perfuziju (5). Visoke koncentracije renina se povezuju i sa bubrežnim tumorima (2).

RAS inhibitori se koriste za liječenje kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti zadnjih 30 godina. Hiperaktivnost RAS kaskade je dio patofiziologije bubrežnih bolesti. Aktivirani RAS sustav potiče sistemsku i glomerularnu kapilarnu hipertenziju što može inducirati hemodinamsku ozljedu vaskularnog endotela i glomerula. Izravna profibrotska i protuupalna aktivnost angiotenzina II i aldosterona također može dovesti do bubrežne ozljede. Povećano stvaranje angiotenzina II i aldosterona povezano je s ozljedama bubrega, primjerice stanja povezana s



proteinurijom kao što su dijabetičke i nedijabetičke nefropatije. Proteinurija osim što je marker rizika bubrežne bolesti također doprinosi ozljedi bubrega (95).

### **2.3.3 Lokalizacija renina**

Renin je lokaliziran prvenstveno u JGA, i to u jukstaglomerularnim stanicama koje ga izlučuju, ali i u glomerulima i dovodnoj arterioli. Međutim, nedavne studije su zabilježile lokalizaciju renina i u proksimalnim zavijenim kanalićima, distalnim zavijenim kanalićima i sabirnim cijevima. Zabilježena je i ko-lokalizacija renina s kalikreinom u sabirnim cjevčicama. U sabirnim cjevčicama i cijevima renin je izražen u glavnim stanicama (ko-lokalizira s akvaporinom 2), a smatra se da dolazi i do formacije angiotenzinskog peptida u distalnim dijelovima nefrona. U tim dijelovima nefrona angiotenzin II stimulira ekspresiju renina što je u suprotnosti s inhibitornim utjecajem angiotenzina II na jukstaglomerularni renin (106-108).

### **2.4 Kalikrein-kinin sustav (KKS)**

Kalikrein je serinska proteaza koju proizvode sabirne cjevčice u bubregu i ima ulogu u pretvaranju kininogena u kinin. Kinin se veže na kininske receptore kao što je npr. bradikininski receptor. Iako tkivni kalikrein nije primarna komponenta u regulaciji krvnog tlaka, dokazano je da kod povišenog krvnog tlaka dolazi do smanjene sinteze i pojačane bubrežne ekskrecije ovog enzima (15).

Kalikreini se nalaze u žljezdanim stanicama, neutrofilima i biološkim tekućinama te su podijeljeni u dvije skupine: kalikreini plazme te tkivni ili žljezdani kalikreini. Kinini su vazoaktivna komponenta ovog sustava, otpuštaju se pod utjecajem kalikreina i utječu na brojne fiziološke procese (109).

Kalikrein-kinin sustav ima utjecaja na razne procese kao što su regulacija krvnog tlaka, upala, stanična proliferacija, odgovor na analgeziju, mehanizmi prijenosa boli, otpuštanje citokina, prostaglandina i dušikovog oksida (NO) (109, 110). Rast, razvoj i uspostavljanje fizioloških funkcija bubrega ovisi o brojnim faktorima rasta i vazoaktivnim hormonima koji djeluju parakrinom signalizacijom, a takav sustav je KKS. U razvoju se prekursori renina javljaju u

arterijskom stablu i JGA, a kalikrein u distalnom nefronu, ali se smatra da oba sudjeluju u razvoju i sazrijevanju bubrega (111).

Poveznica između KKS i RAS sustava je u ACE enzimu. ACE (kininaza II) je enzim (karboksipeptidaza) koji uklanja dipeptid His-Leu s angiotenzina I i pretvara ga u angiotenzin II, ali i uklanja Phe-Arg s bradikinina i na taj način ga inaktivira. Pronađeno je da ACE čak ima veći afinitet za bradikinin nego za angiotenzin I. Ravnoteža ova dva sustava je izrazito bitna za regulaciju krvnog tlaka (2, 110, 112).

Smatra se da tkivni kalikrein može imati ulogu u konverziji prorenina u aktivni renin. U usporedbi s reninom koji se proizvodi u JGA, za renin sabirnih cjevčica i cijevi se smatra da ima lokalnu parakrinu funkciju. Ekspresija renina i kalikreina u odvodnim kanalima koja su pod utjecajem hormona aldosterona doprinosi teoriji da imaju sinergističko djelovanje na reapsorpciju natrija i ekskreciju kalija. Smatra se kako bi onda sabirne cjevčice i cijevi imale finiju i razrađeniju strategiju u kontroli elektrolita i posljedično vode nego što je ranije bilo prepoznato (108).

## 2.5 Sinaptopodin i nefrin

Podociti su stanice koje sudjeluju u stvaranju glomerularne filtracijske membrane. Imaju primarne i duge sekundarne nožice između kojih se nalaze *slit* dijafragme, otvori veličine oko 40 nanometara. Zbog svojih strukturnih karakteristika, podociti se identificiraju ekspresijom niza gena koji kontroliraju proizvodnju međustanične tvari te oblikovanje i funkciju nožica podocita. Mutacije tih gena se povezuju s bubrežnim bolestima. Ozljeda podocita se pokazala kao ključni indikator progresije bubrežne bolesti, kao npr. u dijabetičkoj nefropatiji koja je glavni uzrok terminalnog stadija bubrežne bolesti. U toj bolesti dolazi do smanjenja broja podocita koji onda vodi do gubitka vitalnih nefrona i izrazite proteinurije (11, 12).

Nefrin je transmembranski protein izražen na *slit* dijafragmama nožica podocita. Bitan je za diferencijaciju podocita i njihovu pravilnu funkciju (26). Sinaptopodin je također citoskeletni protein bitan za stvaranje nožica podocita i migraciju podocita (113, 114).

U patološkim stanjima kao što su glomerularne bolesti i fokalna segmentalna glomeruloskleroza, dolazi do promjena u ovim proteinima (27). Nedavne studije pokazuju da količina sinaptopodina u urinu može biti prediktor glomerularne ozljede u naprednim stadijima

bubrežne bolesti (114). Promjene u citoskeletnim filamentima su pokazane i u kroničnoj bubrežnoj bolesti uzrokovanoj nefrotskim sindromom Finskog tipa (28).

## **2.6 $\alpha$ -SMA (eng. *alfa smooth actin*) i CD31**

$\alpha$ -SMA je pretežno izražen u glatkom mišiću razvijenih krvnih žila (115), a u razvoju je osim u glatkim mišićnim stanicama izražen i u pericitima (116), a dijelom i u podocitima (28).

CD31 (ili PECAM-1) je član obitelji imunoglobulina i izražen je pretežno u endotelnim stanicama, ali i nekim komponentama krvi (117).

Istraživanje na eksperimentalnim životinjama pokazalo je ekspresiju CD31 u endotelu krvnih žila u bubregu (118), a to potvrđuje i studija na razvojnim ljudskim bubrezima (28).

Studije na životinjama povezuju promjene u ekspresiji CD31 s aterosklerozom (119).

Pojačana ekspresija  $\alpha$ -SMA u kroničnoj bubrežnoj bolesti povezuje se s povećanim brojem miofibroblasta u intersticiju sklerotičnih bubrega kao i s revaskularizacijom i regeneracijom zahvaćenih bubrega (118, 120).

## **2.7 Nefrotski sindrom Finskog tipa (CNF) i kronična bubrežna bolest (KBB)**

Kongenitalni nefrotski sindrom Finskog tipa je rijetka autosomno recesivna nasljedna bolest kojoj je svojstven masivni gubitak bjelančevina i edem koji se pojavljuje već *in utero* ili u prva 3 mjeseca postnatalnog života. Sindrom se naziva Finski tip jer ima visoku incidenciju u Finskoj (1:8000 rođene djece), a uzrokovan je s dvije NPHS1 mutacije u većini slučajeva. U nefrotskom sindromu dolazi do disfunkcije glomerularne filtracijske membrane i morfoloških promjena u podocitima, koji postupno dovode do kronične bubrežne bolesti (28, 121-123).

Različite bolesti koje dovode do kronične bubrežne bolesti (KBB) dijele isti mehanizam nastanka. Razvoj KBB je rezultat upale te patološkog nagomilavanja međustaničnog matriksa (124). Studije o KBB su pokazale promjene izražaja koneksina, no javljaju se i oprečni rezultati vezani za pojedine koneksine (125, 126). Primjerice, porast Cx43 u podocitima kod štakora je viđen u eksperimentalnom glomerulonefritisu i dijabetesu tipa II, a snižena koncentracija u

dijabetičkoj nefropatiji. To može ukazivati na ulogu Cx43 kao markera ozljede podocita (11, 127).

Nedavne studije su ukazale na važnost RAS-a u patogenezi tranzicije između akutne i kronične bubrežne bolesti (128, 129).

Studija o ekspresiji koneksina u stanjima koja uzrokuju KBB na mišjem modelu je pokazala porast Cx43 i sniženu razinu Cx37 (125). Hipertenzivni miševi tretirani blokatorom Cx43 su pokazali poboljšanje bubrežne funkcije (126).

Biopsije pacijenata s KBB su pokazale visoku ekspresiju Cx43 (126).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da koneksini imaju važnu ulogu u oblikovanju i funkciji bubrežnih kanalića te glomerula, osobito tijekom prenatalnog razvoja i diferencijacije bubrežnog tkiva. Zbog važnosti navedenih Cx proteina, rađene su brojne eksperimentalne studije o njihovoj zastupljenosti u bubrežnom tkivu, no postoji vrlo malo podataka o njihovoj ekspresiji u ljudskim bubrezima tijekom razvoja. Ekspresija različitih podtipova Cx uglavnom je opisivana u štakorskim i mišjim postnatalnim bubrezima, prvenstveno u proksimalnim i distalnim kanalićima, no nerijetko studije pokazuju oprečne rezultate (69). Isto tako, vrlo su rijetke i studije na ljudskim razvojnim bubrezima, koje su rezultirale ograničenom količinom podataka (85, 86).

Malobrojni dokazi u literaturi o ekspresiji Cx u bubrezima odraslih ljudi uglavnom ukazuju na ulogu Cx43 u bubrežnim bolestima (11, 130). S obzirom na značaj Cx u normalnom razvoju bubrega kao i njegovoj patologiji, te odsustvu podataka na ljudskim embrionalnim tkivima, naše istraživanje donosi nove informacije o ulozi Cx upravo u ljudskim razvojnim bubrezima kao i patološki promijenjenim bubrezima u CNF-u.

Iako nema dovoljno dokaza o međuovisnosti između koneksina i renina u ljudskim bubrežnim stanicama, posebno tijekom razvoja, podatci koji dolaze iz eksperimentalnih studija podupiru važnost ove problematike. Studije na eksperimentalnim životinjama pokazale su povezanost Cx37, Cx40 i Cx45 s regulacijom oslobađanja renina i kontrolom arterijskog tlaka (72, 73, 75).

### **3. CILJEVI I HIPOTEZA**

### 3.1 Ciljevi istraživanja

1. Koristeći metodu imunofluorescencije ispitati te usporediti prostornu i vremensku ekspresiju Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 u različitim stadijima razvoja nefrona i glomerula tijekom fetalnog i postnatalnog razvoja bubrega u čovjeka te u CNF-u.
2. Dvostrukom imunofluorescencijom ispitati postoji li ko-ekspresija koneksina s bjelančevinama sinaptopodinom, nefrinom, CD31 i  $\alpha$ -SMA i kako ona utječe na oblikovanje pojedinih dijelova nefrona i glomerula te na razvoj krvnih žila tijekom normalnog razvoja bubrega kao i u CNF-u.
3. Primjenom metode imunofluorescencije ispitati te usporediti izražaj renina u različitim stadijima fetalnog i postnatalnog razvoja bubrega u čovjeka te u CNF-u.
4. Dvostrukom imunofluorescencijom ispitati ko-ekspresiju Cx i renina u različitim stadijima razvoja krvnih žila i JGA tijekom fetalnog i postnatalnog razvoja bubrega kod čovjeka te u CNF-u.
5. Dvostrukom imunofluorescencijom ispitati postoji li ko-ekspresija renina i kalikreina u prenatalnom i postnatalnom bubregu te bubrezima zahvaćenim CNF-om.
6. Transmisijskim elektronskim mikroskopom ispitati morfološke osobitosti stanica pozitivnih na koneksine u prenatalnom i postnatalnom bubregu te u CNF-u, kao i preciznu lokalizaciju renina unutar različitih bubrežnih stanica.
7. Semi-kvantitativno odrediti lokalizaciju pojedinih istraživanih čimbenika unutar bubrežnog tkiva.
8. Statističkom analizom površina ispod krivulje (AUC) histograma intenziteta fluorescencije koneksina i renina istražiti promjenu u intenzitetu signala pojedinih čimbenika tijekom normalnog prenatalnog i postnatalnog razvoja te promjenu u intenzitetu i značenje te promjene u CNF-u.

### 3.2 Hipoteza istraživanja

Istraživanje izražaja (ekspresije) i ko-ekspresije različitih podtipova Cx te razvojnih čimbenika endotelnih (CD31), glatkih mišićnih stanica ( $\alpha$ -SMA), nefrina, sinaptopodina, renina, kalikrein tijekom prenatalnog i postnatalnog razvoja ljudskog bubrega ukazuje na njihovu važnost u razvoju dijelova nefrona, krvnih žila i kontroli tlaka. Analiza bubrega zahvaćenih CNF-om pokazuje odstupanje od normalnog prostorno-vremenskog izražaja navedenih čimbenika.

#### **4. METODE I MATERIJALI**



## 4.1 Biološki materijali

Parafinski blokovi fetalnih i postnatalnih bubrega korišteni su iz arhive Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu i Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Ukupan broj ispitanih uzoraka razvojnih stadija bubrega je 11. Embriionalno i fetalno tkivo prikupljeno je nakon spontanih pobačaja i tubarnih trudnoća uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC-a Split i Medicinskog fakulteta u Splitu (klasa: 003-08/16-03/0001, broj: 2181-198-03-04-16-0024). Dob zametaka je procijenjena između 8. i 38. razvojnog tjedna na temelju podataka o posljednjoj menstruaciji te mjerenjem udaljenosti tjeme-zadak, opsega glave i trbuha te duljine femura (Carnegie sustav) te je samo dobro očuvano i morfološki ispravno tkivo korišteno u istraživanju.

Postnatalno tkivo bubrega starosti 1,5 godine je prikupljeno nakon smrti uzrokovanih nesretnim slučajem.

Također je korišteno tkivo 3 bolesnika s nefrotskim sindromom Finskog tipa uz privolu roditelja. Kako bismo potvrdili tu dijagnozu napravljena je i genska analiza. Izolirana je DNA korištenjem leukocita iz periferne krvi. Zatim je provedeno testiranje kojim je pronađena homozigotna *missense* mutacija NPHS1 gena (c.1096A > C; p.Ser366Arg).

Izrazito vrijedni i teško dostupni ljudski materijali koje smo koristili u ovom istraživanju imaju neprocjenjivu važnost, ali posredno i limitiran broj uzoraka.

## 4.2 Metode

### 4.2.1 Priprema tkiva bubrega za histološku analizu

Tkivo je fiksirano u 4% PFA (paraformaldehid) u 0.1 M PBS-a preko noći. Nakon toga slijedi ispiranje radnim PBS-om, dehidracija tkiva bubrega u rastućoj seriji otopina etanola (70%, 95%, 100%, 100%) te u ksilenu. Tkivo je potom uklopljeno u parafinske blokove, mikrotomom izrezano na serijske rezove debljine 5  $\mu$ m te postavljeno na predmetna stakalca.

Kao priprema za histološko bojanje, stakalca su priređena standardnim postupkom, deparafinizacija u ksilolu (3x5'), rehidracija u seriji rastućih otopina etanola (100% 10', 100% 10', 95% 5', 70% 5') i ispiranje u vodi (5').

#### **4.2.2 Hematoksilin-eozin bojanje**

Hematoksilin-eozin bojanje svakog desetog reza je služilo za potvrdu stadija (starosti) embrija i očuvanosti tkiva. Uzorci su prvotno inkubirani u otopini Meyerova hematoksilina u trajanju od 15', ispirani u običnoj mlakoj vodi te zatim prebačeni u otopinu eozina (4-5'). Uslijedilo je dehidriranje serijom rastućih otopina etanola i ksilenom. Uzorci su prekriveni Canada balsamom i pokrovnim stakalcem, te proučavani svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51, Tokyo, Japan).

#### **4.2.3 Imunofluorescencijsko bojanje**

Uzorci su kuhani u citratnom puferu (pH=6.2) 30' koristeći kuhalo za vodu te ohlađeni na sobnu temperaturu. Nakon ispiranja tkiva s PBS-om, uzorci su odvojeni PAP pen-om te prekriveni Protein blok otopinom u trajanju od 20', kako bi se spriječilo nespecifično bojanje tkiva. Uzorci su inkubirani s primarnim protutijelima u vlažnoj komori preko noći. Nakon ispiranja PBS-om nanese su sekundarna protutijela te lektini i inkubirani su u vlažnoj komori u mraku, jedan sat.

Tkivo je zatim ispirano PBS-om i nanesen je DAPI, boja za jezgre (2'). Uzorci su uklopljeni u Immu-mount medij i prekriveni pokrovnim stakalcem.

Kontrola za specifičnost je bila izuzimanje primarnog protutijela iz procedure bojanja.

Uzorci su pregledani na fluorescencijskom mikroskopu (Olympus BX61, Tokyo, Japan) koristeći digitalnu kameru DP71 (mikrofotografije zabilježene sa softverom Olympus Cella) te digitalnu kameru DS-Ri2 (softver NIS-Elements F). Korišteni su objektivni povećanja 10x, 40x i 100x. Mikrofotografije su obrađene i preklopljene uz pomoć Adobe Photoshop softvera (Adobe, San Jose, CA, USA) te analizirane pomoću ImageJ softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

##### **4.2.3.1 Protutijela**

###### Primarna protutijela:

Kuniće anti-Cx37/GJA4 protutijelo (1:500 razrjeđenje, ab181701, Abcam, Cambridge, UK)

Kuniće anti-Cx40/GJA5 protutijelo (1:100 razrjeđenje, ab213688, Abcam, Cambridge, UK)

Kozje anti-Cx43/GJA1 protutijelo (1:200 razrjeđenje, ab87645, Abcam, Cambridge, UK)

Kunićje anti-Cx45/GJA7 protutijelo (1:100 razrjeđenje, ab135474, Abcam, Cambridge, UK)

Mišje anti-Renin [7D3-E3] protutijelo (1:100 razrjeđenje, ab134783, Abcam, Cambridge, UK)

Pročišćeno mišje anti-štakorsko CD31 protutijelo (1:100 razrjeđenje, Clone TLD-3A12, BD Pharmingen™, CA, USA)

Mišje Smooth Muscle Actin protutijelo (1:200 razrjeđenje, M0851, Dako, Denmark)

Kozje Nephrin Ab (G-20) protutijelo (1:200 razrjeđenje, sc-32530, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)

Kunićje anti-Synaptopodin protutijelo (1:300, ab117702, Abcam, Cambridge, UK)

Kozje anti-Kallikrein 6 protutijelo (1:100, ab191281, Abcam, Cambridge, UK)

#### Sekundarna protutijela:

Magareće anti-kozje IgG, Alexa Fluor® 488 protutijelo (1:400 razrjeđenje, ab150129, Abcam, Cambridge, UK)

Magareće anti-kunićje IgG, Alexa Fluor® 488 protutijelo (1:400 razrjeđenje, 711-545-152, Jackson Immuno Research, Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA)

Magareće anti-mišje IgG, Alexa Fluor® 488 protutijelo (1:400 razrjeđenje, ab150105, Abcam, Cambridge, UK)

Magareće anti-kozje IgG, Rhodamine Red™-X (RRX) protutijelo (1:400 razrjeđenje, 705-295-003, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA)

Magareće anti-kunićje IgG, Rhodamine (TRITC) protutijelo (1:400 razrjeđenje, 711-025-152, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA)

Magareće anti-mišje IgG, Alexa Fluor® 488 protutijelo (1:400 razrjeđenje, ab150105 , Abcam, Cambridge, UK)

#### Lektini:

Fluorescein Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) (1:300 razrjeđenje, FL-1031, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK)

Fluorescein Lotus Tetragonolobus Lectin (LTL) (1:300 razrjeđenje, FL-1321, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK)

#### 4.2.4 Elektronska mikroskopija

Tkivo je fiksirano s 4% PFA u 0.1M PBS preko noći. Uzorci su poslije fiksirani otopinom 1%-osmijevog tetroksida te nakon toga kratkotrajno isprani u destiliranoj vodi. Dehidracija je trajala dva sata u seriji otopina rastućih koncentracija acetona (30-100%). Potom su uzorci uklopljeni u DURCUPAN smolu. Polutanki rezovi su rezani na 1  $\mu\text{m}$  i bojani 1%-tnim toluidinskim modrilom te pregledani i fotografirani svjetlosnim mikroskopom. Ultratanki rezovi su rezani na debljinu 0,05  $\mu\text{m}$  na ultramikrotomu, dvostruko kontrastirani otopinom uranil acetata i olovnog citrata te analizirani i fotografirani transmisivskim elektronskim mikroskopom (JEM JEOL 1400, Japan).

#### 4.2.5 Analiza podataka

Mikrofotografije su prvo obrađivane u programu ImageJ (Rasband,W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Kako bi se izolirala čistoća signala određenog kanala korištena je naredba „split channels“. Potom se, ovisno o boji pojedinačne mikrofotografije, oduzimao zeleni ili crveni kanal postupkom „image calculator“. Iz dobivene fotografije zatražen je histogram intenziteta fluorescencije, također u ImageJ-u, što je rezultiralo tablicom u kojoj je brojevima od 0 do 256 (0 odgovara crnoj boji, a 256 bijeloj) pripisivan određeni broj piksela sa slike. Prag kojim je isključena pozadina slike su odredila tri iskusna histologa pojedinačno za svaku sliku.

U programu Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, California, USA) su preklapane mikrofotografije istih područja kore bubrega, a različitih kanala (crveni, zeleni i plavi). Na preklopljenim mikrofotografijama promatrana su mjesta gdje je bio izražen i crveni i zeleni signal. Plavi signal koji označava DAPI bojanje jezgara je služio za orijentaciju i određivanje strukture bubrega u kojoj se nalazi signal. Adobe Photoshop je također korišten za izradu panela za usporedbu različitih stadija razvoja bubrega te različitih proteina.

#### 4.2.6 Semikvantitativna analiza

Tri autonomna istraživača su odabranim protutijelima pripisivali sljedeće kategorije jakosti intenziteta: odsutnost reaktivnosti (-); blaga reaktivnost (+); umjerena reaktivnost (++) i jaka reaktivnost (+++).

#### 4.2.7 Statistički postupci

Histogrami intenziteta fluorescencije za crveni i zeleni fluorescencijski kanal su dobiveni programom ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Ekspresija različitih proteina je kvantificirana kao površina ispod krivulje (area under the curve – AUC) histograma intenziteta fluorescencije. Površina ispod krivulje je izračunata u programu GraphPad Prism 8.0 i 8.3 (Graph Pad, La Jolla, CA, USA).

Statistička analiza te 95%-tni interval pouzdanosti za usporedbu prostorno-vremenskog izražaja Cx 37, 40, 43 i 45 proveden je ANOVA testom s post hoc analizom Tukey test, razina značajnosti  $P=0.05$ . Ekspresija koneksina tijekom razvoja je analizirana vršcima (peak) koristeći t-test.

Za analizu dinamike ekspresije i trendova različitih proteina u razvoju u jukstaglomerularnom području koristili smo linearne i nelinearne modele regresije, također u GraphPad programu (GraphPad Prism 8.3). Za usporedbe meana (prosjeak) fluorescencije između dvije grupe je korišten t-test, razina značajnosti  $P=0.05$ . Rezultati su izraženi kao prosjek  $\pm$  standardna devijacija (SD).

## **5. RESULTATI**

Tijekom ranog razvoja čovjeka, dolazi do bitnog procesa koji se zove mezenhimsko-epitelna transformacija (MET). Mokraćovodni pupoljak ima važnu funkciju u poticanju metanefričke kape na stvaranje bubrežnog mjehurića s lumenom u sredini. Tijekom daljnjeg razvoja dolazi do stvaranja S-oblika nefrona te potom nezrelog glomerula i ostalih dijelova nefrona. Prvi znakovi razvoja glomerula se javljaju u osmom razvojnom tjednu kada dolazi do komunikacije S-oblika i budućih krvnih žila glomerula. Izražaj različitih koneksina, uključujući Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 je prisutan u 8.-10. razvojnom tjednu u dijelovima nefrona i krvnim žilama, kao i u jukstaglomerularnom području. Izražaj istraživanih proteina se mijenja tijekom razvoja te u postnatalnom zdravom i patološki promijenjenom tkivu. Dvostruka imunofluorescencija, polutanki rezovi, elektronska mikroskopija i statistička analiza su korišteni u svrhu istraživanja izražaja i dinamike izražaja proteina Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, renina, sinaptopodina, nefrina, CD31,  $\alpha$ -SMA i kalikreina.

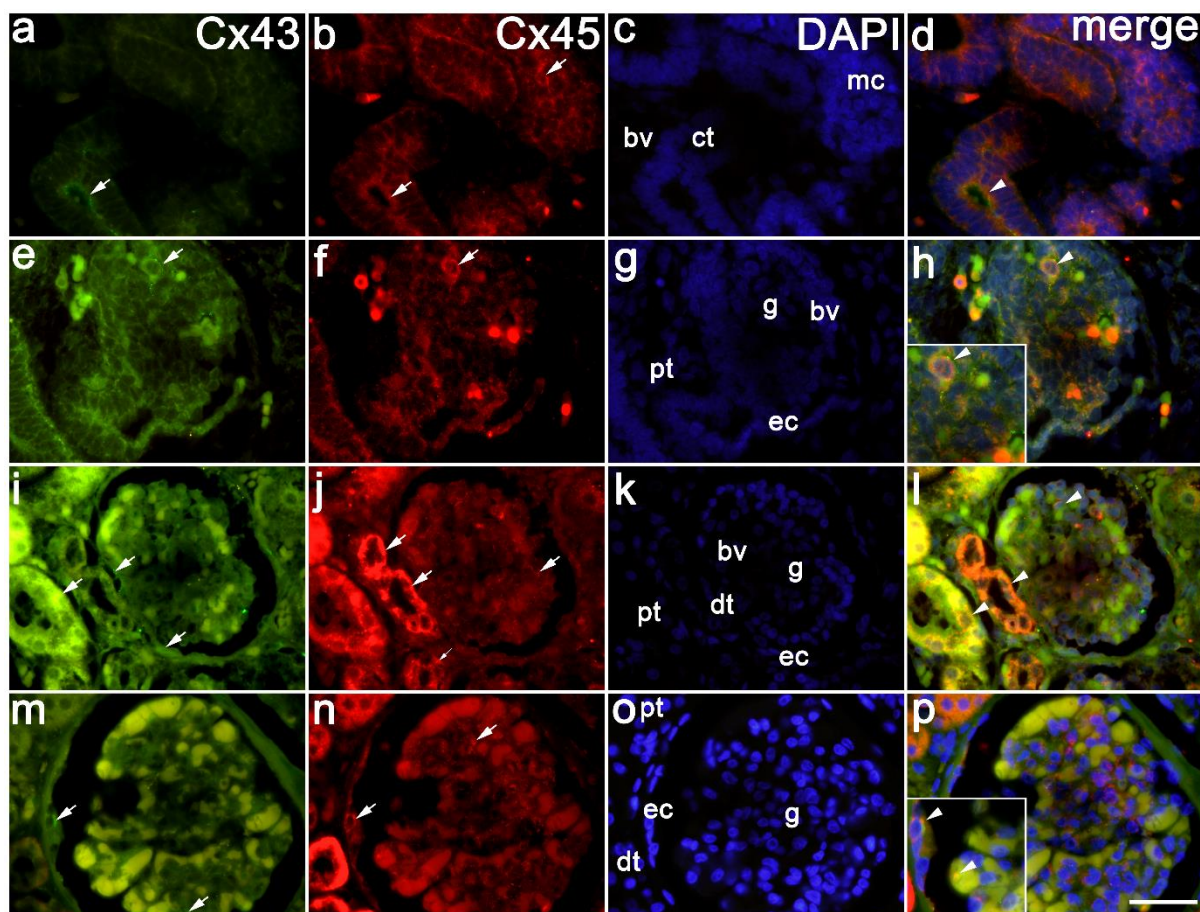
## **5.1 Dvostruka imunofluorescencijska metoda za usporedbu izražaja različitih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) u prenatalnom i postnatalnom tkivu ljudskog bubrega te u bubrezima zahvaćenim CNF-om**

### **5.1.1 Ko-ekspresija Cx43 i Cx45 u razvojnom i postnatalnom tkivu bubrega**

U najranijim stadijima razvoja bubrega uočena je ko-ekspresija Cx45/Cx43 u metanefričkoj kapi i sabirnim kanalićima (Slika 6a-d). U nerazvijenom glomerulu Cx43 se nalazi u endotelnim stanicama krvnih žila, a Cx45 u perifernom dijelu krvnih žila (glatke mišićne stanice) pa ne dolazi do njihovog preklapanja. Cx45 pokazuje jaki izražaj u nekim stanicama u glomerulu (najvjerojatnije mezangijskim stanicama) (Slika 6e-h) (4).

U kasnijem razvoju, Cx45 je izražen u svim strukturama u bubregu, a slaba ekspresija Cx43 je opažena u glomerulima, proksimalnim i distalnim kanalićima. Cx43 je također uočen u dovodnoj i odvodnoj arterioli te parijetalnim epitelnim stanicama. Cx43 i Cx45 i u kasnijim stadijima razvoja su izraženi u različitim stanicama iste strukture (Tablica 1, Slika 6i-l) (4).

U postnatalnim bubrezima su Cx43 i Cx45 također izraženi u istim strukturama, a različitim stanicama, kao što su npr. podociti, vaskularni zid i parijetalne epitelne stanice. Izražaj Cx43 je umjeren, a Cx45 jak (Slika 6m-p, umetak Slika 6p, Tablica 1) (4).



**Slika 6.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje Cx43 i Cx45 u razvojnim i postnatalnim ljudskim bubrezima. Bubrezi ljudskog embrija u 8. tjednu razvoja (**a-d**); bubrezi ljudskog embrija u 10. tjednu razvoja (**e-h**); bubrezi ljudskog fetusa u 38. tjednu razvoja (**i-l**); postnatalno tkivo bubrega (1,5 godina) (**m-p**). Legenda: ekspresija Cx43 i Cx45 (strelice), metanefrička kapa (mc), sabirni kanalići (ct), krvne žile (bv), glomeruli (g), parijetalne epitelne stanice (ep), proksimalni zavijeni kanalići (pt), distalni zavijeni kanalići (dt). DAPI bojanje jezgara (**c, g, k, o**). Preklapljenje mikrofotografije (merge) pokazuje ko-ekspresiju Cx45/Cx43 (vrhovi strelica) u istim strukturama, ali različitim stanicama. Umetak u (**h**) pokazuje kolokalizaciju Cx43 i Cx45 u mezangijskim stanicama, a umetak u (**p**) u podocitima. Povećanje: (**a-p**) x100.



Tjedni/godine	DIO NEFRONA	Cx43	Cx45	Cx40	Cx37	Syn	CD31	$\alpha$ -SMA
8-10 tjedana	metanefrička kapa	+	+++	++	++/ +++	-	++	++
	nezreli glomerul	+	+++	++/+++	+	-	++	++
	sabirni kanalići	+	++/+++	+++	+++	-	-	-
21-22 tjedna	glomerul	+	++	++	++	++	+++	+++
	proksimalni zavijeni kanalić	+	+++	+++	+	+	-	-
	distalni zavijeni kanalić	+	++	++	++	+	-	-
38 tjedana	glomerul	+	++	++	++	++	+++	+++
	proksimalni zavijeni kanalić	+	+++	++	+	+	-	-
	distalni zavijeni kanalić	++	++	++	++	+	-	-
1,5 godina	glomerul	+/+ +	+++	+	++	++	+++	+++
	proksimalni zavijeni kanalić	++	+++	++	+	+	-	-
	distalni zavijeni kanalić	++	++	+++	++	+	-	-
CNF - cca 1,5 godina	glomerul	++	+++	++	+++	++	+/++	++
	proksimalni zavijeni kanalić	++	+++	++	+/-	+/-	-	-
	distalni zavijeni kanalić	+++	++	+++	+++	+/-	-	-

**Tablica 1.** Ekspresija različitih koneksina, CD31 i  $\alpha$ -SMA u bubrezima tijekom prenatalnog razvoja, postnatalnim bubrezima i bubrezima sa CNF-om.

### 5.1.2 Ko-ekspresija različitih koneksina s CD31 i $\alpha$ -SMA u razvojnim i postnatalnim bubrezima

U 8.-10. razvojnom tjednu, u ljudskom bubregu se nalaze svi dijelovi nefrona, s tim da su prvi (nezreli) glomeruli lokalizirani najbliže budućoj srži bubrega. U stanicama metanefričke kape

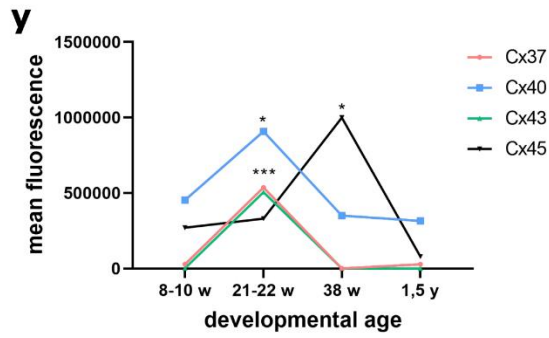
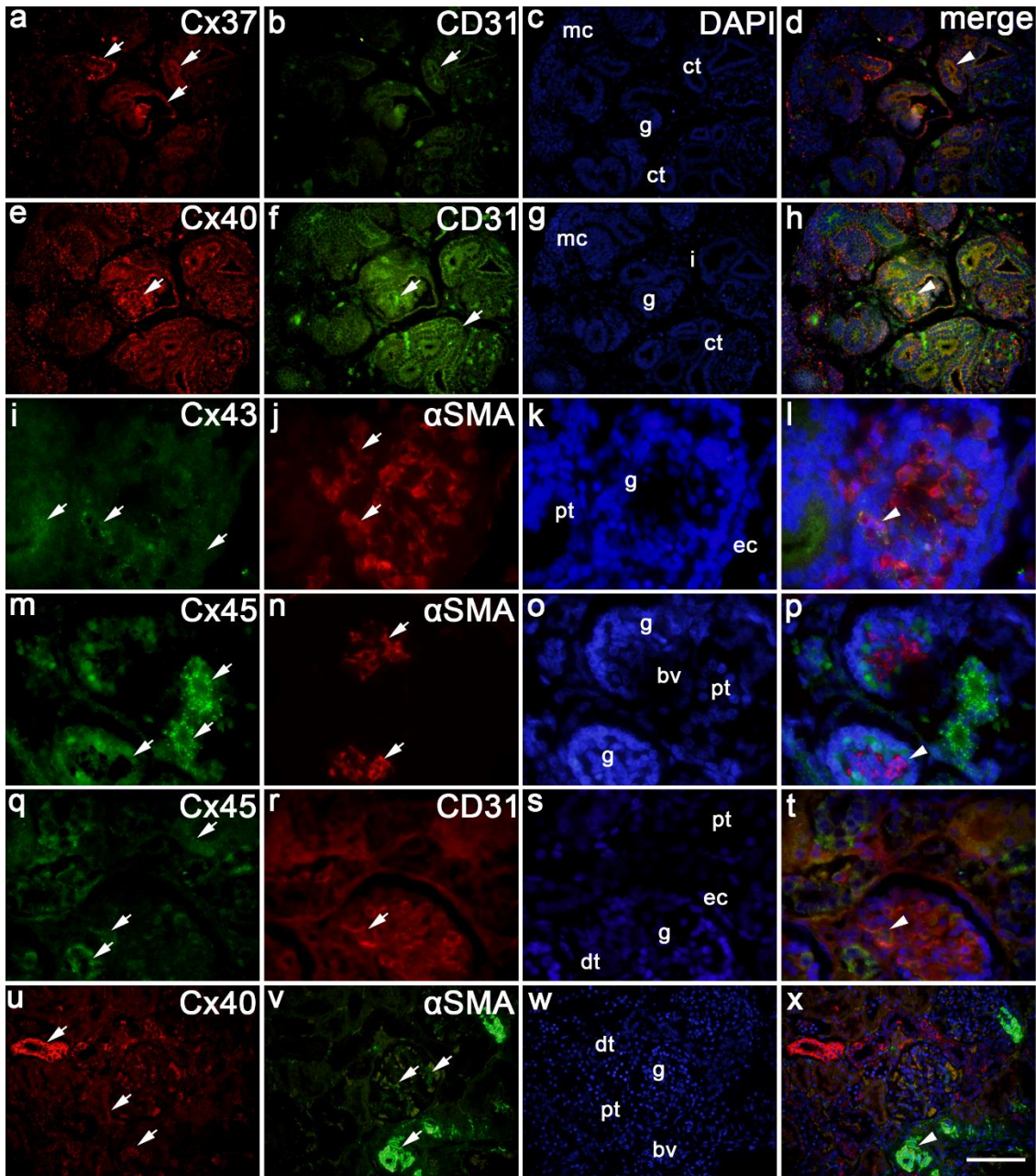
je jaki izražaj Cx45, umjereni Cx40 i Cx37, dok Cx43 pokazuje slabi izražaj. Što se tiče nezrelog glomerula i sabirnih kanalića, Cx43 je izražen slabo, Cx40 umjereno do jako u obliku gustih zrnaca, dok Cx45 pokazuje jaku ekspresiju. Cx37 pokazuje umjereni izražaj u stanicama metanefričke kape i nezrelim glomerulima, dok je jako izražen u sabirnim kanalićima u obliku krupnih zrnaca (Tablica 1, Slika 7a,e,i) (4).

Dvostruko bojanje CD31 sa Cx40 i Cx37 (Slika 7a-d, e-h) te dvostruko bojanje  $\alpha$ -SMA sa Cx43 (Slika 7i-l) pokazuje njihovu ko-lokalizaciju u zidu glomerularnih krvnih žila (4).

Između 10. i 38. razvojnog tjedna glomeruli postepeno sazrijevaju, a proksimalni i distalni kanalići dobivaju svoj karakterističan izgled te ih možemo sa sigurnošću razlikovati. Tijekom tog razdoblja, Cx45 je umjereno izražen u glomerulima i distalnim kanalićima, a u proksimalnim kanalićima pokazuje jaku ekspresiju (Slika 7m,q). Cx40 je izražen umjereno do jako u sve tri strukture, a Cx43 pokazuje blagi porast izražaja prema umjerenom. Ekspresija Cx37 je umjerena u cijelom bubregu osim u proksimalnim kanalićima, gdje Cx37 pokazuje slabi izražaj (Tablica 1) (4).

Između 22. i 38. razvojnog tjedna, u zidu krvnih žila je uočena umjerena do jaka ekspresija Cx45 koji pokazuje ko-ekspresiju s jakim izražajem CD31 i  $\alpha$ -SMA (Tablica 1, Slika 7m-p,q-t) (4).

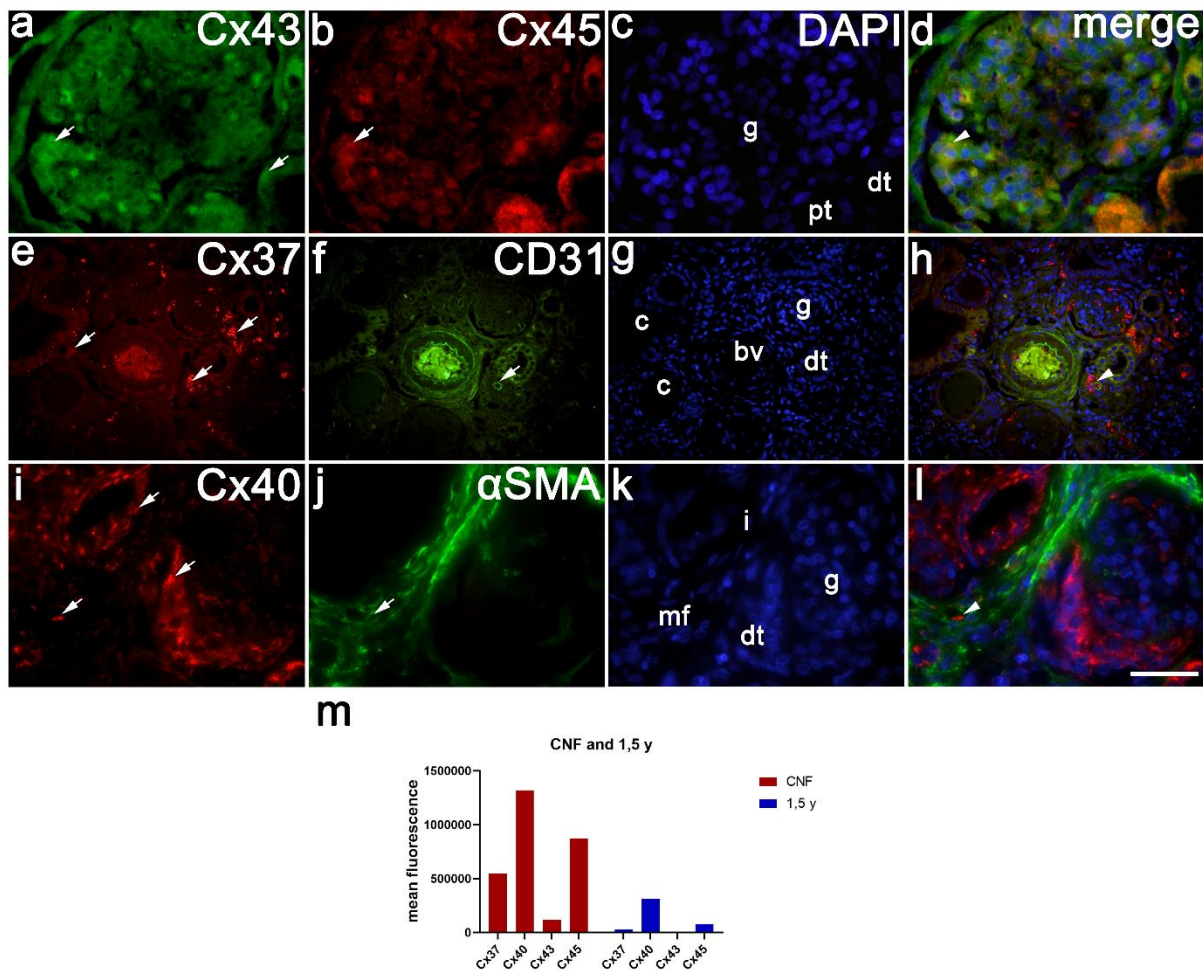
U postnatalnim zdravim bubrezima, izražaj Cx43 se povećava od slabog do umjerenog u svim strukturama u bubregu, a izražaj Cx45 se pojačava samo u glomerulima. Ekspresija Cx40 je blaga u glomerulima i umjerena u proksimalnim kanalićima, a jaka u distalnim kanalićima. Ekspresija Cx37 ne pokazuje promjene u izražaju u postnatalnim zdravim bubrezima (Tablica 1, Slika 7u). Dvostruko bojanje Cx40 i  $\alpha$ -SMA pokazuje ko-lokalizaciju u glomerularnim i ekstraglomerularnim krvnim žilama (Slika 7u-x) (4).



**Slika 7.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje različitih koneksina (Cx43, Cx45, Cx40 i Cx37) sa  $\alpha$ -SMA i CD31 u prenatalnim i postnatalnim ljudskim bubrezima. Bubrezi ljudskog embrija u 8. tjednu razvoja (**a–d,e–h**); bubrezi ljudskog embrija u 10. tjednu razvoja (**i–l**); bubrezi ljudskog fetusa u 22. tjednu razvoja (**m–p**); bubrezi ljudskog fetusa u 38. tjednu razvoja (**q–t**); bubrezi djeteta od 1,5 godine (**u–x**). Legenda: ekspresija Cx37 i Cx40 (strelice), CD31 i  $\alpha$ -SMA (strelice), metanefrička kapa (mc), nezreli glomeruli (g), krvne žile (bv), intersticij (i), proksimalni zavijeni kanalići (pt) i distalni zavijeni kanalići (dt). DAPI bojanje jezgara (**c, g, k, o, s, w**). Preklopljene mikrofotografije (merge) različitih koneksina s CD31 i  $\alpha$ -SMA pokazuju ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u zidu krvnih žila (**d, h, l, p, t, x**). Povećanje: dvostruka imunofluorescencija Cx37 i CD31 s DAPI bojanjem (**a–d**) i Cx40 i CD31 (**e–h**) x20; DAPI i Cx45/CD31 (**q–t**) x100; dvostruka imunofluorescencija DAPI sa Cx43/  $\alpha$ -SMA (**i–l**) i Cx45/  $\alpha$ -SMA (**m–p**) x100; DAPI sa Cx40/  $\alpha$ -SMA x20 (**u–l**). Histogrami intenziteta fluorescencije različitih koneksina tijekom razvoja i u postnatalnom periodu (**y**). Legenda: razvojna dob (developmental age), tjedan (w), godina (y), prosjek fluorescencije (mean fluorescence).

### 5.1.3 Ko-ekspresija različitih koneksina s CD31 i $\alpha$ -SMA u CNF-u

U bubrezima zahvaćenim nefrotskim sindromom Finskog tipa, glomeruli pokazuju različite stupnjeve patoloških promjena, a proksimalni kanalići izgledaju prošireno jer sadrže male ciste. U CNF-u dolazi do promjena u izražaju i raspodjeli različitih koneksina u usporedbi sa zdravim postnatalnim tkivom: ekspresija Cx40 i Cx37 se pojačava u distalnim kanalićima, a Cx45 i Cx43 pokazuju smanjenje ekspresije u glomerulima (Tablica 1). Cx43 i Cx45 pokazuju ko-ekspresiju u različitim stanicama iste bubrežne strukture (Tablica 1, Slika 8a-d). Cx37 pokazuje nepravilan izražaj u obliku grubih zrnaca u glomerulu te dijelovima proksimalnih i distalnih kanalića. U zahvaćenim glomerulima Cx40 pokazuje smanjenje ekspresije, u distalnim kanalićima izražaj Cx40 se povećava, a u intersticiju je taj izražaj umjerenog tipa. Dvostruka imunofluorescencija Cx40 i  $\alpha$ -SMA pokazuje njihovu ko-lokalizaciju u miofibroblastima u intersticiju (Slika 8i-l). Cx37 i CD31 ko-lokaliziraju u zidu krvnih žila (Slika 8e-h) (4).



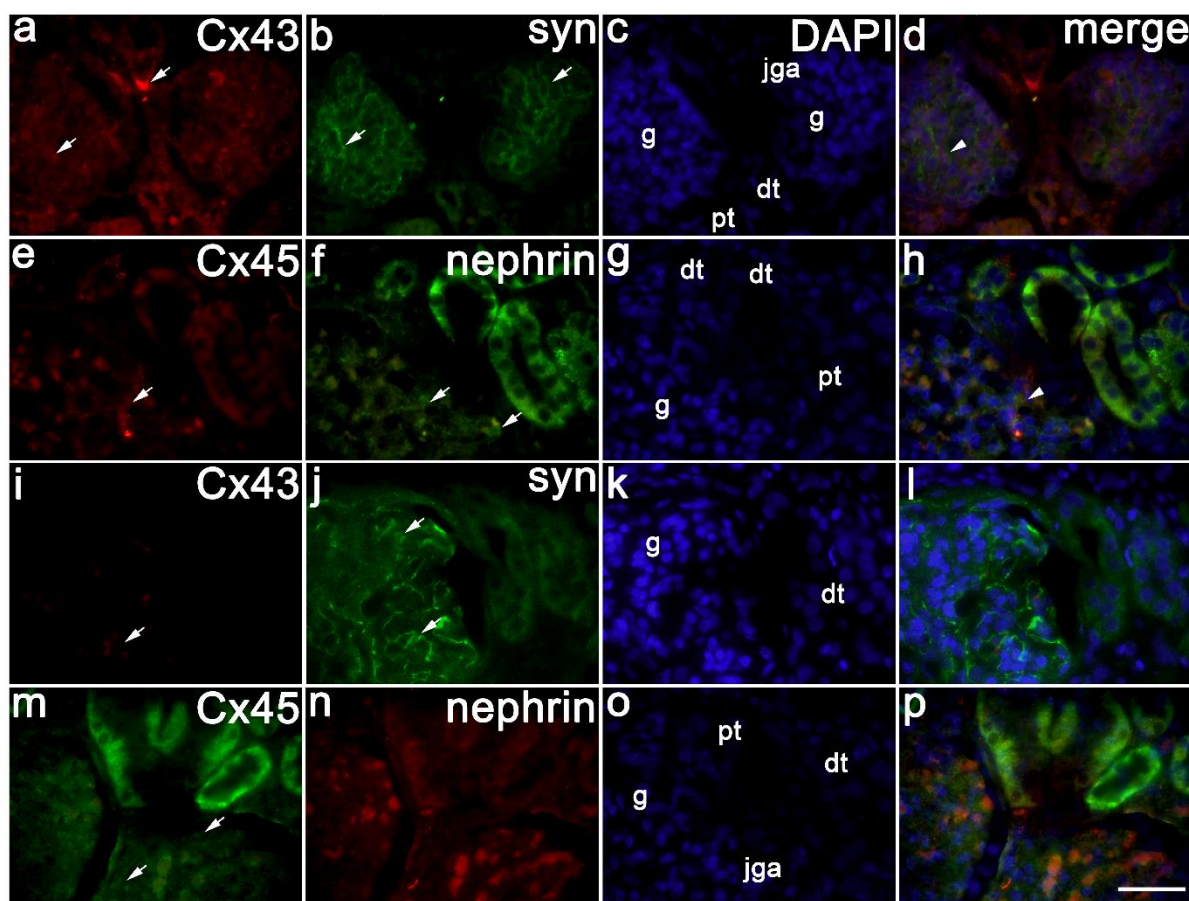
**Slika 8.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje različitih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) sa  $\alpha$ -SMA i CD31 u bubrezima zahvaćenim CNF-om. Postnatalni bubrezi zahvaćeni CNF-om (**a-l**). Legenda: izražaj Cx43, Cx40 i Cx37 (strelice), CD31 i  $\alpha$ -SMA (strelice), glomeruli (g), proksimalni kanalići (pt), distalni kanalići (dt), ciste proksimalnih kanalića (c), krvne žile (bv) i intersticij (i). DAPI bojanje jezgara (**c,g,k**). Preklopljene mikrofotografije (merge) različitih koneksina s CD31 i  $\alpha$ -SMA pokazuju ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u zidu krvnih žila i intersticijskim miofibroblastima (mf) (**d,h,l**). Povećanje: dvostruko imunofluorescencijsko bojanje DAPI-jem sa Cx43/Cx45 (**a-d**) x100; DAPI i Cx37/CD31 (**e-h**) x20; DAPI i Cx40/  $\alpha$ -SMA x100 (**i-l**) x100. Histogrami intenziteta fluorescencije koji pokazuju usporedbu zdravih postnatalnih bubrega i postnatalnih bubrega zahvaćenih CNF-om (**m**). Legenda: godina (y), prosjek fluorescencije (mean fluorescence).



#### 5.1.4 Ko-ekspresija nefrina i sinaptopodina s različitim koneksinima u razvojnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim CNF-om

Sinaptopodin ne pokazuje izražaj u bubrežnim strukturama prije 10. tjedna (Tablica 1). U 22. tjednu Cx43 je blago izražen u glomerulima, proksimalnim i distalnim kanalićima. U istom razvojnom tjednu, sinaptopodin je umjereno izražen u glomerulima te blago u proksimalnim i distalnim kanalićima (Tablica 1). Ko-ekspresija Cx43 i sinaptopodina je djelomična u stanicama glomerula i najvjerojatnije se odnosi na podocyte, kao i ko-ekspresija Cx45 s nefrinom (Slika 9e-h) (4).

Bubrezi zahvaćeni CNF-om pokazuju smanjenje izražaja sinaptopodina u glomerulima, dok je njihov izražaj u proksimalnim i distalnim kanalićima vrlo slab (Tablica 1, Slika 9i-h). Nije uočena ko-ekspresija Cx43 i sinaptopodina u podocitima (Slika 9i-l). Nefrin pokazuje blagi izražaj u glomerulima CNF bubrega (Slika 9m-p) (4).



**Slika 9.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje sinaptopodina i nefrina s različitim koneksinima (Cx43 i Cx45). Razvojni ljudski bubrezi u 22. tjednu (**a-d,e-h**); postnatalni

bubrezi zahvaćeni CNF-om (**i-l,m-p**). Legenda: ekspresija Cx43 i Cx45 (strelice), sinaptopodina i nefrina (strelice), glomeruli (g), proksimalni (pt) i distalni zavijeni kanalići (dt), jukstaglomerularno područje (jga). DAPI bojanje jezgara (**c,g,k,o**). Preklopljene mikrofotografije (merge) Cx43 ili Cx45 sa sinaptopodinom pokazuju njihovu ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u glomerulima (podocitima) zdravih bubrega (**d,h**) i odsutnost njihove ko-ekspresije u bubrezima zahvaćenim CNF-om (**l,p**). Povećanje: (**a-p**) x100.

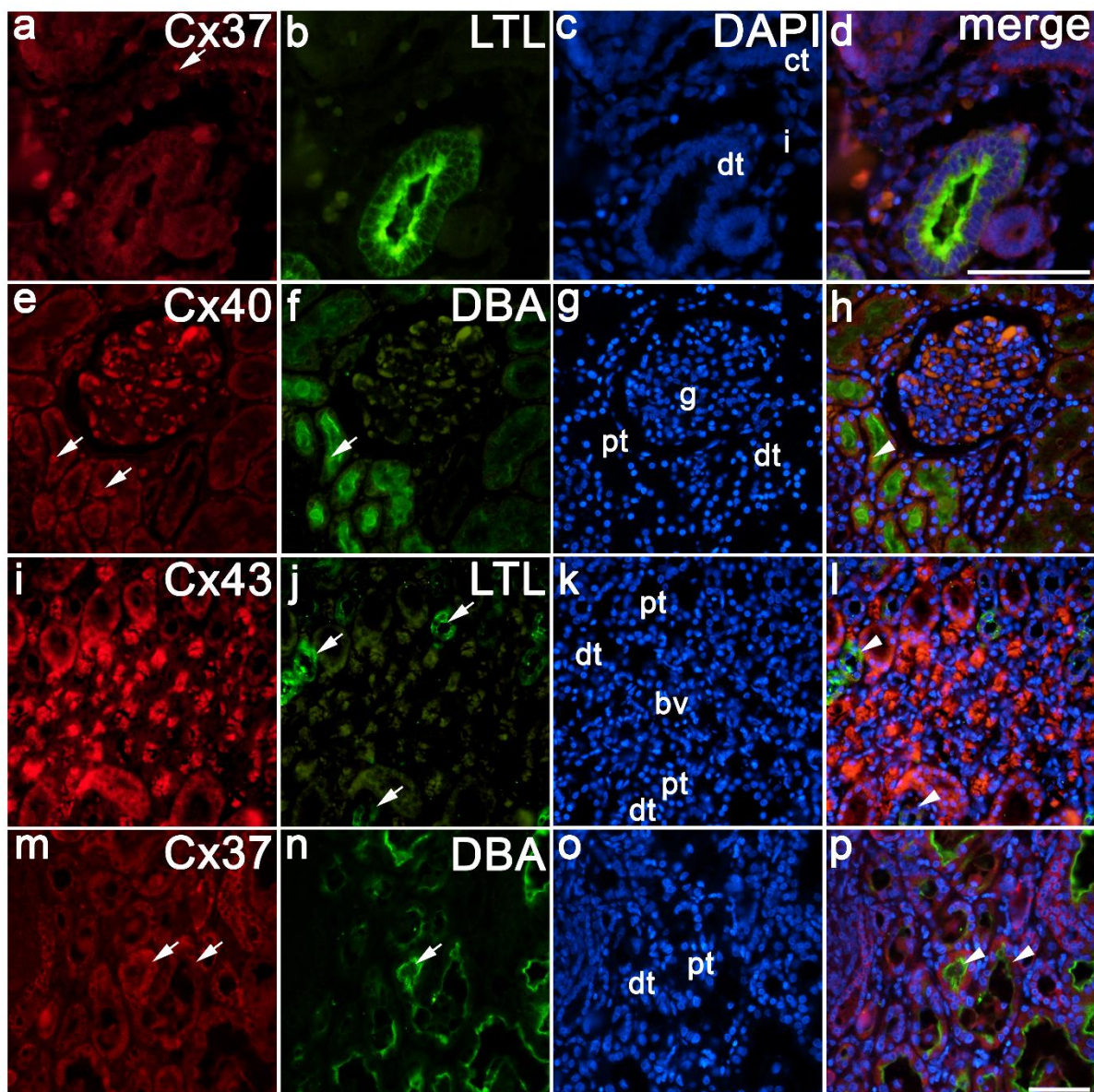
### **5.1.5 Ko-ekspresija različitih koneksina s markerima za proksimalne (DBA) i distalne zavijene kanaliće (LTL) u prenatalnim i postnatalnim bubrezima te bubrezima zahvaćenim CNF-om**

U ranom razvoju, tijekom 8.-10. tjedna, mali broj tubula je pokazao reaktivnost na LTL dok nije bilo izraženog signala za DBA. Dvostruko bojanje Cx37 i LTL je pokazalo odsustvo njihove ko-ekspresije u distalnim kanalićima, ali je uočena ekspresija Cx37 u sabirnim kanalićima (Tablica 1, Slika 10a-d) (4).

Imunofluorescencijskim bojanjem postnatalnog tkiva bubrega dobiveni su drukčiji rezultati, DBA je pokazao jaku reaktivnost u proksimalnim kanalićima, a LTL u distalnim. Uočena je ko-ekspresija Cx40 i DBA u proksimalnim kanalićima (Slika 10e-h) te ko-ekspresija Cx43 i LTL u distalnim kanalićima (Slika 10i-l) (4).

U bubrezima zahvaćenim CNF-om, prošireni proksimalni kanalići su jako označeni markerom DBA. Dvostrukom fluorescencijom Cx37 i DBA pokazana je ko-ekspresija u proksimalnim kanalićima (4).

Specifičnim markerima za proksimalne i distalne kanaliće dokazali smo da su naši morfološki kriteriji za razlikovanje kanalića u kori bubrega u korelaciji sa kanalićima označenim specifičnim markerom (4).

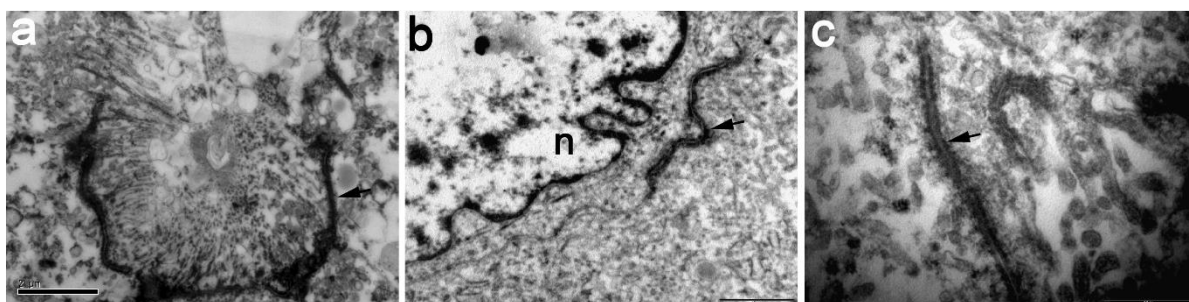


**Slika 10.** Ko-ekspresija različitih koneksina (Cx37, Cx40 i Cx43) s markerima za proksimalne (DBA) i distalne zavijene kanaliće (LTL) u razvojnim i postnatalnim bubrezima te bubrezima zahvaćenim CNF-om. Bubrezi ljudskog embrija u 10. razvojnom tjednu (**a-d**); ljudski postnatalni bubrezi od 1,5 godine (**e-h, i-l**); postnatalni bubrezi zahvaćeni CNF-om (**m-p**). Legenda: ekspresija Cx37, Cx40 i Cx45 (strelice), ekspresija markera za proksimalne (DBA) i distalne kanaliće (LTL) (strelice), proksimalni zavijeni kanalići (pt), distalni zavijeni kanalići (dt), sabirni kanalići (ct), intersticij (i), glomeruli (g), krvne žile (bv). Ko-ekspresija Cx37 i LTL-a nedostaje u 10. razvojnom tjednu (**a-d**), a ko-ekspresija Cx40 i DBA (vrhovi strelica) (**e-h**) i Cx43/LTL (vrhovi strelica) (**i-l**) je prisutna u postnatalnom tkivu bubrega. Ko-ekspresija Cx37 s DBA (vrhovi strelica) u bubregu zahvaćenom CNF-om (**m-p**). Preklopljenje mikrofotografije (merge) (**d-p**). Povećanje: (**a-p**) x40.



## 5.2 Elektronska mikroskopija koneksina u razvojnim bubrezima i CNF-u

Brojni tijesni spojevi koji povezuju epitelne tubularne stanice su prisutni u 6. razvojnom tjednu (Slika 11a). Tijekom daljnjeg razvoja, tijesni spojevi se nalaze u raznim dijelovima bubrega, kao što su stanice glomerula (Slika 11b). U bubrezima zahvaćenim CNF-om, osim karakterističnog poravnjanja nožica podocita, uočeno je da su koneksini prisutni u cijelom tkivu, no najviše među tubularnim stanicama (Slika 11c) (4).



**Slika 11.** Transmisijska elektronska mikroskopija koneksina u razvojnom tkivu bubrega te u CNF bubrezima. Koneksini (a) (strelice) između tubularnih stanica u 6. razvojnom tjednu; koneksini (b) (strelica) izraženi u stanicama bubrežnih glomerula u 21. razvojnom tjednu; koneksini (c) (strelice) između tubularnih stanica CNF bubrega.

## 5.3 Kvantifikacija i semi-kvantifikacija izražaja koneksina tijekom razvoja ljudskog bubrega i u postnatalnom razdoblju

Semikvantifikacija ekspresije koneksina u različitim dijelovima nefrona je pokazana u Tablici 1.

Analiza prosjeka signala fluorescencije različitih koneksina je rezultirala saznanjem o značajnoj razlici maksimalnog signala (vrška) između koneksina. Naime, Cx37, Cx43 i Cx40 su pokazali slično uzorkovanje intenziteta fluorescencijskog signala, najjači izražaj je bio u 21. razvojnom tjednu, s tim da je Cx40 u tom tjednu bio najjače izražen ( $P=0.0003$ ,  $P=0.02$ ,  $P<0.0001$ , redom). Najjaču ekspresiju fluorescencijskog signala je pokazao Cx45 s vrškom u 38. tjednu ( $P=0.03$ ). U postnatalnom periodu intenzitet fluorescencije je opadao, osim za Cx40

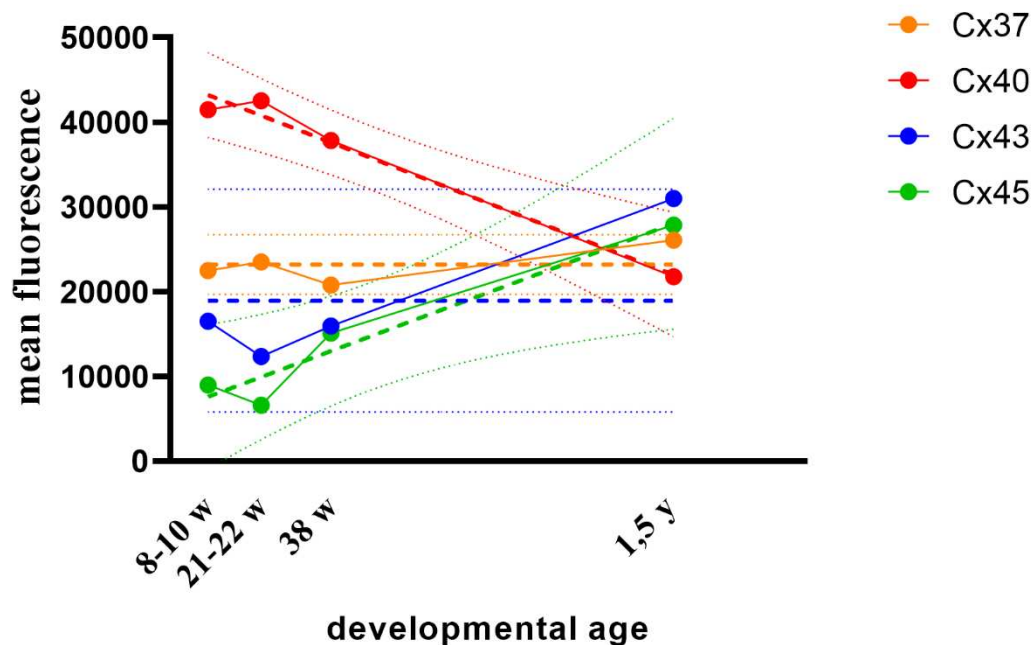
čiji je intenzitet fluorescencije ostao visok (Slika 7y). U CNF bubregu svi koneksini su pokazali jači izražaj u usporedbi sa zdravim postnatalnim bubrezima (Slika 8m) (4).

#### 5.4 Dvostruka imunofluorescencijska metoda za usporedbu izražaja različitih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) i renina u JGA prenatalnog i postnatalnog tkiva ljudskog bubrega te u bubrezima zahvaćenim CNF-om

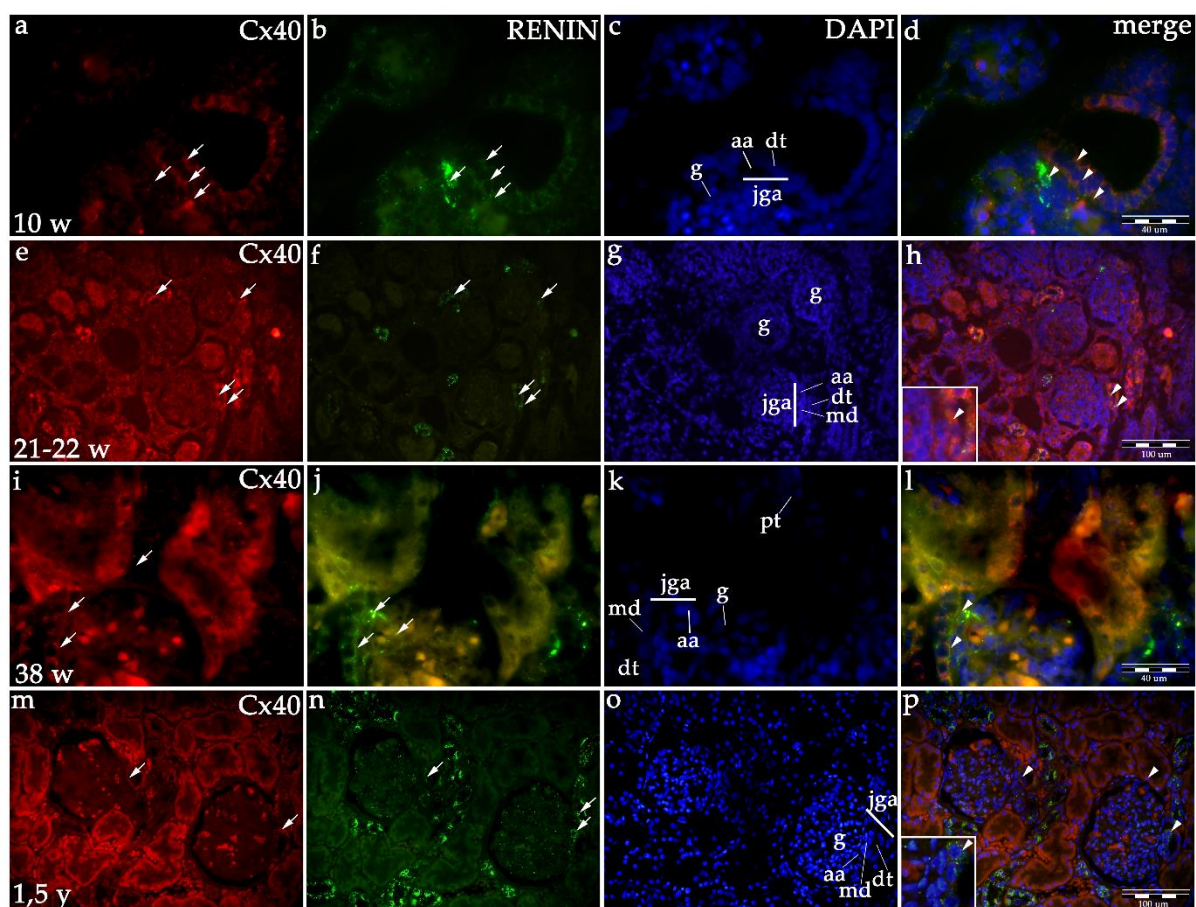
##### 5.4.1 Izražaj Cx40 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega

Tijekom razvoja, Cx40 pokazuje najveću ekspresiju ispitivanih koneksina u JGA. U postnatalnom periodu ekspresija Cx40 opada, a ostalih koneksina (Cx37, Cx43 i Cx45) raste (Slika 12) (131).

Tijekom ranog razvoja bubrega je pokazana umjeren (dovodna arteriola) do jaka (distalni kanalić) ekspresija Cx40 u JGA. Tijekom daljnjeg prenatalnog razvoja, kao i u zdravom postnatalnom tkivu dolazi do smanjene ekspresije Cx40 u JGA (Tablica 2, Slika 12, Slika 13). Linearni model,  $R^2=97.82\%$   $P=0.01$  (Slika 12) (131).



**Slika 12.** Dijagram raspršenja i ručice greške (eng. *error bars*) (95% CI) pokazuju razlike u ekspresiji Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 tijekom ljudskog razvoja bubrega. Legenda: godina (y), tjedan (w), razvojna dob (developmental age), prosjek fluorescencije (mean fluorescence).



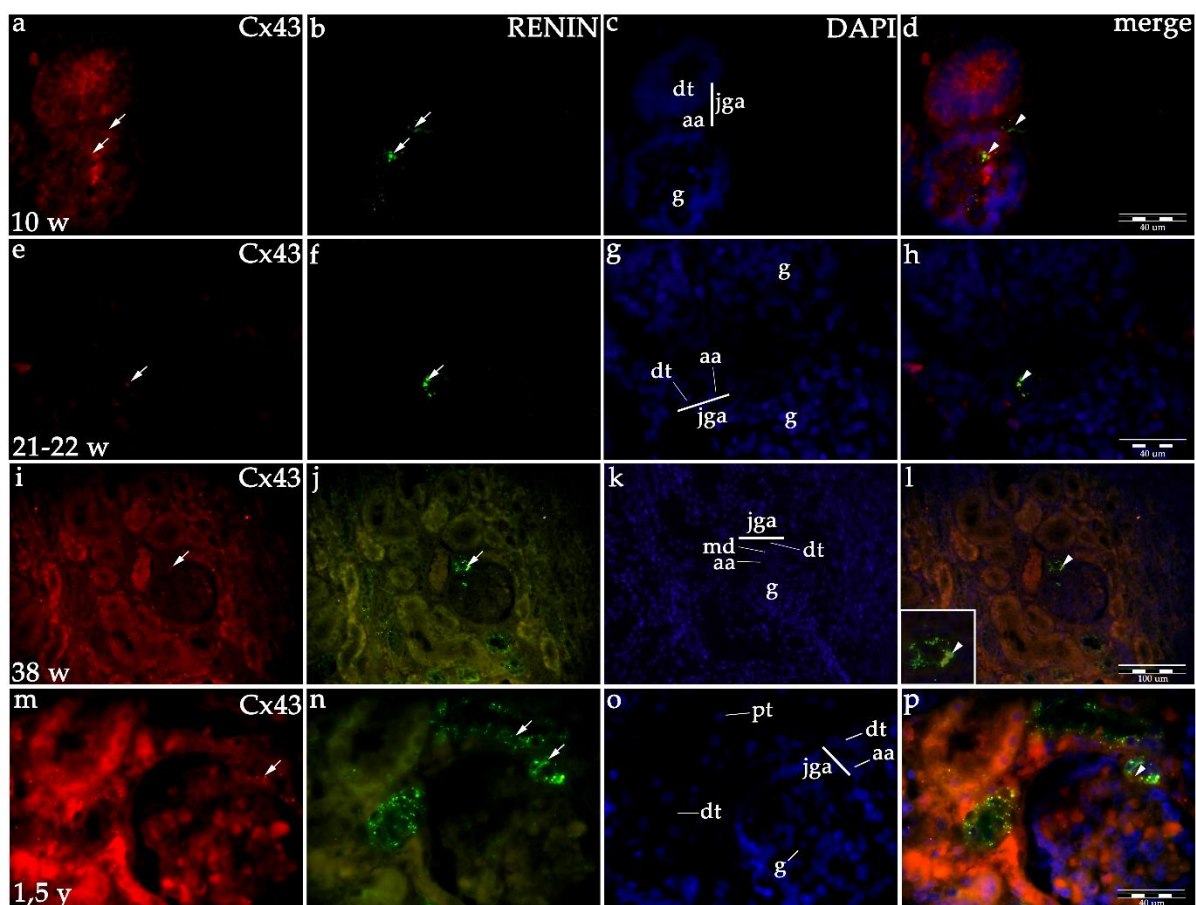
**Slika 13.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje Cx40 i renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega. Bubrezi ljudskog embrija u 8. razvojnom tjednu (**a-d**); bubrezi ljudskog fetusa u 21.-22. razvojnom tjednu (**e-h**); bubrezi ljudskog fetusa u 38. razvojnom tjednu (**i-l**); zdravo postnatalno ljudsko tkivo bubrega (**m-p**). Legenda: glomeruli (g), dovodna arteriola (aa), *macula densa* (md), jukstaglomerularni aparat (jga), proksimalni zavijeni kanalić (pt), distalni zavijeni kanalić (dt), razvojni tjedan (w), godina (y). Ekspresija koneksina ili renina (strelice), DAPI bojanje jezgara (**c,g,k,o**). Preklopljene mikrofotografije (merge) Cx40 i renina pokazuju njihovu ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u JGA (**d,h,l,p**). Povećanje: (**e-h,m-p**) x40; (**a-d,i-l**) x100.

Tjedni/godine	Cx40	Cx43	Cx45	Cx37
8-10 tjedana	++/+++	+/>++	+/>++	+/>++
21-22 tjedna	++/+++	+/>++	+/>++	+/>++
38 tjedana	++	+/>++	+/>++	+/>++
1,5 godina	+/>++	++/+++	++	++
CNF - cca 1,5 godina	+	+++	++/+++	++/+++

**Tablica 2.** Ekspresija različitih koneksina u JGA prenatalnih i postnatalnih zdravih bubrega te u bubregu zahvaćenom CNF-om.

#### 5.4.2 Izražaj Cx43 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega

Tijekom ranog razvoja bubrega izražaj Cx43 u JGA je blag (dovodna arteriola) do umjeren (distalni kanalić). U kasnijem prenatalnom razvoju, izražaj Cx43 se ne mijenja u JGA do 38. tjedna kada izražaj Cx43 postaje umjeren u dovodnoj arterioli i jak u *maculi densi*, što se nastavlja i u postnatalnim bubrezima (Tablica 2, Slika 12, Slika 14). Nije uočen konstantan trend za izražaj Cx43 linearnim modeliranjem ( $R^2=89.09\%$   $P=0.0561$ , Slika 12) (131).



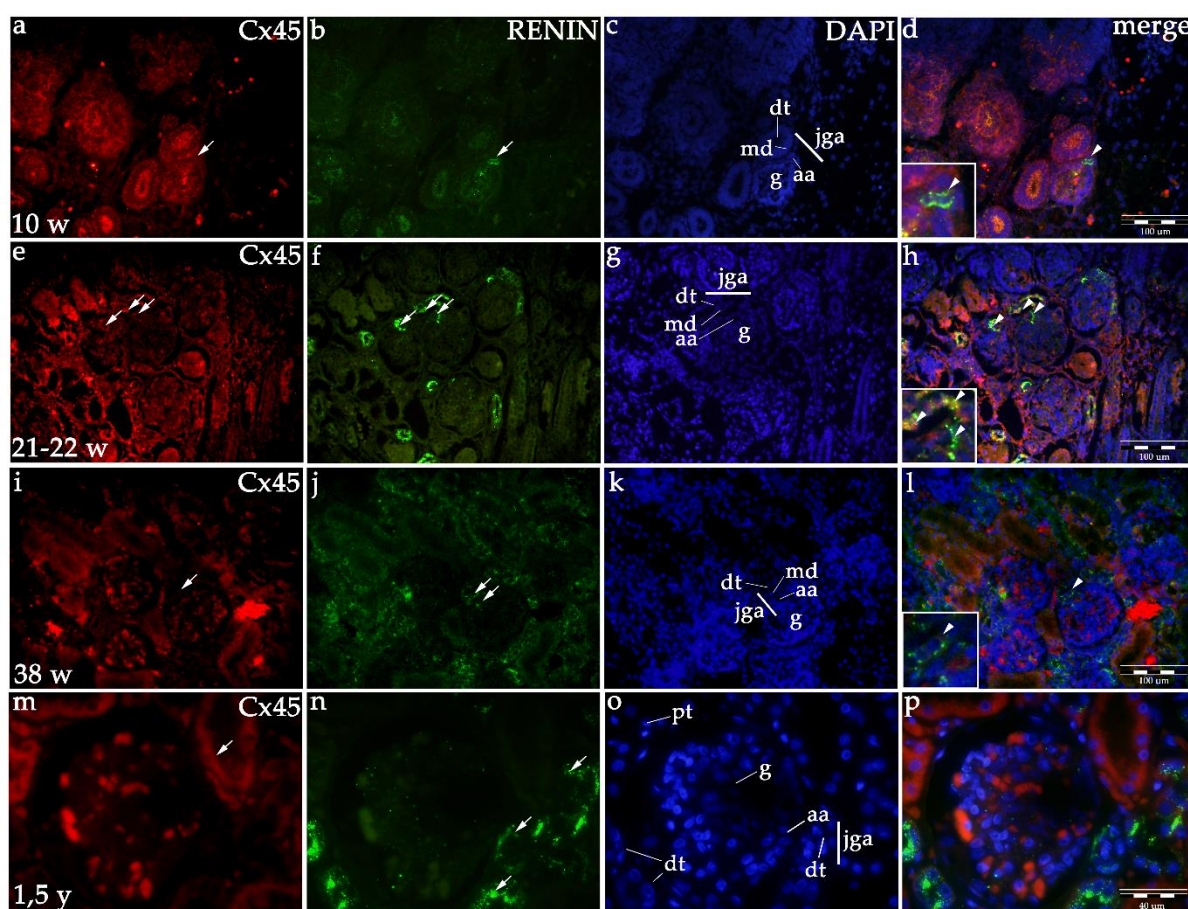
**Slika 14.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje Cx43 i renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega. Bubrezi ljudskog embrija u 8. razvojnem tjednu (**a-d**); bubrezi ljudskog fetusa u 21.-22. razvojnem tjednu (**e-h**); bubrezi ljudskog fetusa u 38. razvojnem tjednu (**i-l**); zdravo postnatalno ljudsko tkivo bubrega (**m-p**). Legenda: glomeruli (g), dovodna arteriola (aa), *macula densa* (md), jukstaglomerularni aparat (jga), proksimalni zavijeni kanalić (pt), distalni zavijeni kanalić (dt), razvojni tjedan (w), godina (y). Ekspresija koneksina ili renina (strelice), DAPI bojanje jezgara (**c,g,k,o**). Preklopljene mikrofotografije (merge) Cx43 i renina pokazuju njihovu ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u JGA (**d,h,l,p**). Povećanje: (**i-l**) x40; (**a-h,m-p**) x100.

### 5.4.3 Izražaj Cx45 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega

U 8.-10. tjednu embrionalnog razvoja, kao i u fetalnom periodu, Cx45 pokazuje blagi (dovodna arteriola) do umjereni (distalni kanalić) izražaj u JGA, a u postnatalnom tkivu je ta ekspresija umjerena te pokazuje samo blagi porast (Tablica 2, Slika 12, Slika 15). To se očituje i



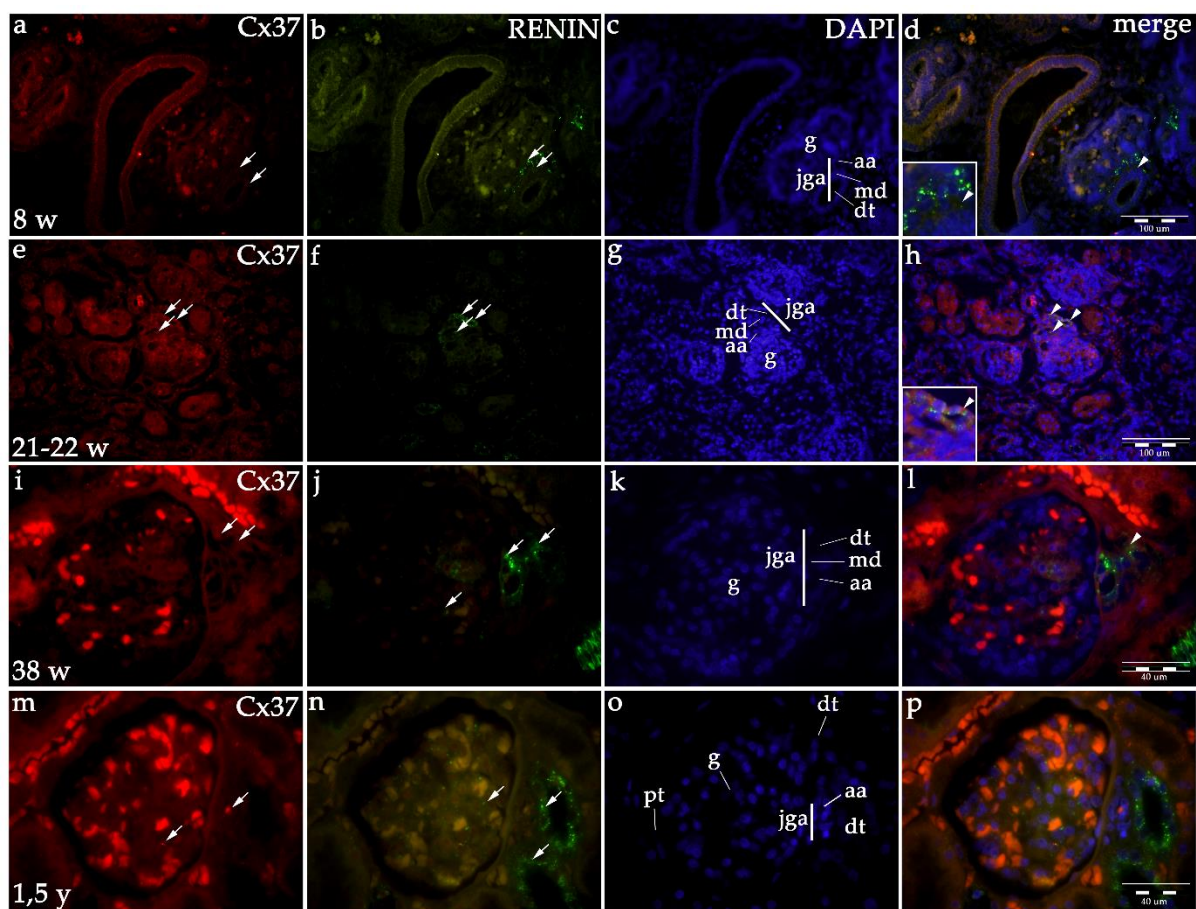
statističkom analizom, gdje je uočen povećavajući linearni trend ( $R^2=93.56\%$   $P=0.0328$ , Slika 12) (131).



**Slika 15.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje Cx45 i renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega. Bubrezi ljudskog embrija u 8. razvojnog tjednu (**a-d**); bubrezi ljudskog fetusa u 21.-22. razvojnog tjednu (**e-h**); bubrezi ljudskog fetusa u 38. razvojnog tjednu (**i-l**); zdravo postnatalno ljudsko tkivo bubrega (**m-p**). Legenda: glomeruli (g), dovodna arteriola (aa), *macula densa* (md), jukstaglomerularni aparat (jga), proksimalni zavijeni kanalić (pt), distalni zavijeni kanalić (dt), razvojni tjedan (w), godina (y). Ekspresija koneksina ili renina (strelice), DAPI bojanje jezgara (**c,g,k,o**). Preklopljene mikrofotografije (merge) Cx45 i renina pokazuju njihovu ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u JGA (**d,h,l,p**). Povećanje: (**a-l**) x40; (**m-p**) x100.

#### 5.4.4 Izražaj Cx37 u prenatalnom i postnatalnom ljudskom tkivu bubrega

U 8. razvojnog tjednu Cx37 nije eksprimiran u JGA, no od 10. tjedna Cx37 je izražen blago do umjereno u JGA i to prvenstveno u distalnim kanalićima (*macula densa*) i dovodnoj arterioli. U postnatalnom tkivu izražaj Cx37 postaje umjeren u JGA (Tablica 2, Slika 12, Slika 16). Statističkom analizom linearnog trenda nije pokazana statistička značajnost ( $R^2=56.95\%$   $P=0.2454$ , Slika 12) (131).



**Slika 16.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje Cx37 i renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega. Bubrezi ljudskog embrija u 8. razvojnog tjednu (**a-d**); bubrezi ljudskog fetusa u 21.-22. razvojnog tjednu (**e-h**); bubrezi ljudskog fetusa u 38. razvojnog tjednu (**i-l**); zdravo postnatalno ljudsko tkivo bubrega (**m-p**). Legenda: glomeruli (g), dovodna arteriola (aa), *macula densa* (md), jukstaglomerularni aparat (jga), proksimalni zavijeni kanalić (pt), distalni zavijeni kanalić (dt), razvojni tjedan (w), godina (y). Ekspresija koneksina ili renina (strelice), DAPI bojanje jezgara (**c,g,k,o**). Preklopljene mikrofotografije (merge) Cx37 i renina pokazuju njihovu ko-ekspresiju (vrhovi strelica) u JGA (**d,h,l,p**). Povećanje: (**a-h**) x40, (**i-p**) x100.

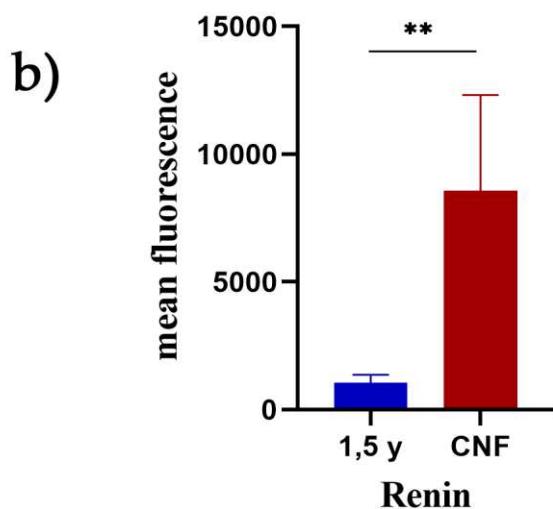
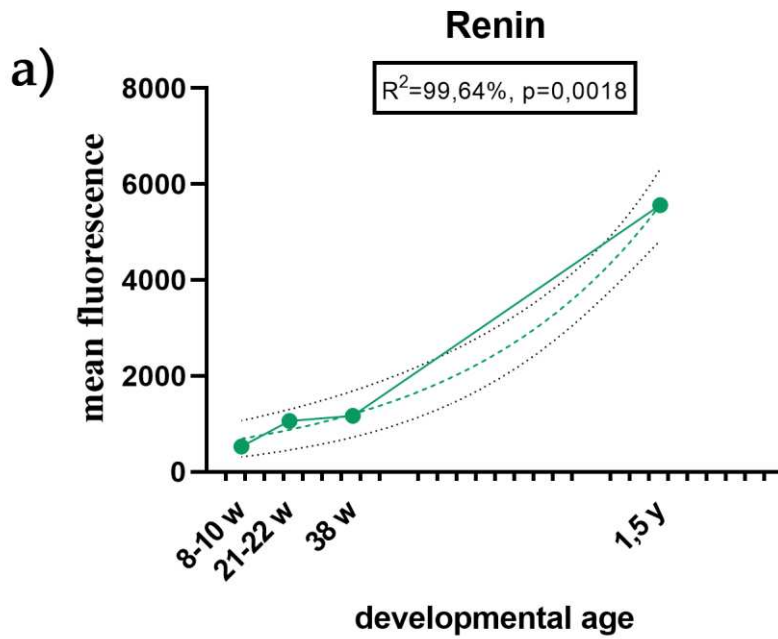
#### **5.4.5 Ko-ekspresija renina i koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) u JGA**

Ko-ekspresija Cx40 i Cx43 s reninom u JGA je izrazito jaka, a ko-ekspresija Cx45 i Cx37 je također izražena, ali u manjoj mjeri (Slika 13, Slika 14, Slika 15, Slika 16) (131).

#### **5.4.6 Izražaj renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega**

Stanice pozitivne na renin su detektirane već u ranom razvoju ljudskog bubrega (8.-10. razvojni tjedan). Tijekom razvoja, osobito gusta zrnca renina se nalaze u *maculi densi* i dijelu distalnog kanalića blizu JGA. Zrnca renina se nalaze i u dovodnoj arterioli, a njihova niska koncentracija vidi se u razvojnim glomerulima i sporadično u intersticiju (mezenhimalne stanice). U postnatalnom periodu se ograničava izražaj renina u *maculi densi*, dijelovima distalnih kanalića i zidu dovodne arteriole (Slika 13, Slika 14, Slika 15, Slika 16 i slika 17a), a u drugim dijelovima nefrona i intersticija renin nije izražen. Ukupna ekspresija renina u JGA pokazuje eksponencijalni rast tijekom razvoja ( $R^2=99.64\%$   $P=0.0018$ ) (Slika 17a) (131).





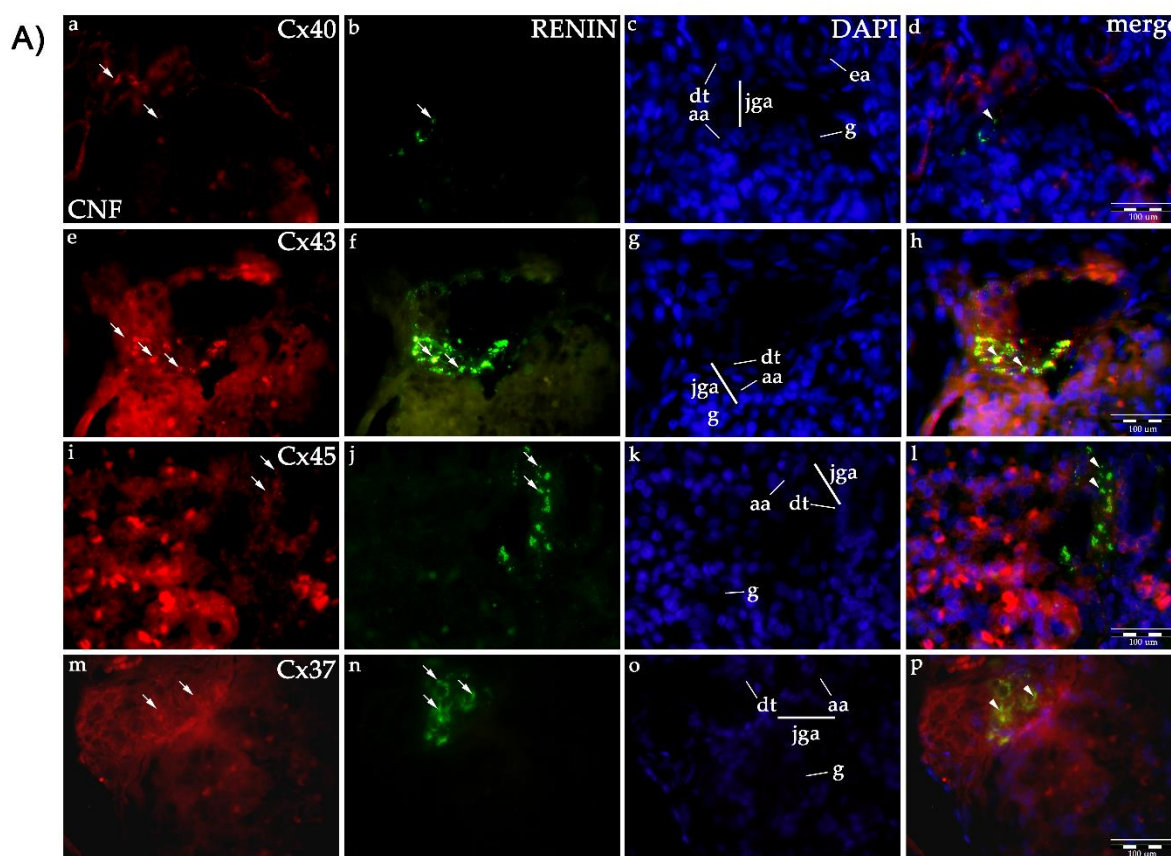
**Slika 17. (a)** Izražaj renina u JGA prenatalnog i postnatalnog ljudskog tkiva bubrega pokazan dijagramom raspršenja (eng. *scatter plot*). **(b)** Izražaj renina u JGA zdravih i CNF-om zahvaćenih postnatalnih bubrega (prosje $\pm$ SD,  $P=0.0072$  za tehničke replikate). Legenda: godina (y), tjedan (w), razvojna dob (developmental age), prosjek fluorescencije (mean fluorescence).

### 5.4.7 Izražaj Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i renina u JGA u CNF-bubrezima

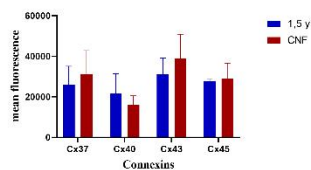
Glomeruli bubrega zahvaćenih CNF-om razlikuju se od zdravih. Jedan dio glomerula može biti normalne veličine, no većinom su manji od normalnih, dok su neki hipertrofični sa proliferacijom mezangijskih stanica i segmentalnom ili globalnom sklerozom.

U CNF bubrezima izražaj renina se značajno povećava u hipertrofičnim glomerulima u odnosu na zdrave postnatalne bubrege (Slika 17b) (131).

CNF bubrege karakterizira izražaj Cx40 u *maculi densi* i dovodnoj arterioli, ali i u glomerulima i parijetalnim epitelnim stanicama (Bowmanova čahura). Ko-ekspresija Cx40 i renina se javlja primarno u JG stanicama dovodne arteriole (Slika 18Aa-d) (131).



B)



**Slika 18.** (A) Izražaj različitih koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45) i renina u JGA području CNF-bubrega. Legenda: glomeruli (g), dovodna arteriola (aa), distalni kanalići (dt),

jukstaglomerularni aparat (jga). DAPI bojanje jezgara (**c,g,k,o**), ko-ekspresija koneksina i renina (vrhovi strelica). Dok je izražaj Cx40 smanjen u JGA CNF bubrega (**a-d**), izražaj Cx43 (**e-h**), Cx45 (**i-l**) i Cx37 (**m-p**) je povećan. Povećanje: (**a-p**) x100. (**B**) Dijagram stupca (prosjek±SD za tehničke replikate) pokazuje razliku ekspresije Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 u zdravim i CNF-om zahvaćenim postnatalnim bubrezima.

Cx43 pokazuje jaki izražaj u dovodnoj arterioli i *maculi densi* u hipertrofičnim glomerulima u CNF-u. Uočena je ko-ekspresija Cx43 i renina u JGA, ali i u glomerulima i stanicama ekstraglomerularnog mezangija (Slika 18Ae-h) (131).

Jaka ekspresija Cx45 je uočena u *maculi densi* i dovodnoj arterioli CNF bubrega, što se razlikuje od rezultata u zdravim postnatalnim bubrezima. Također, povećana ekspresija Cx45 je opažena i u nekim glomerularnim stanicama (Slika 18Ai-l) (131).

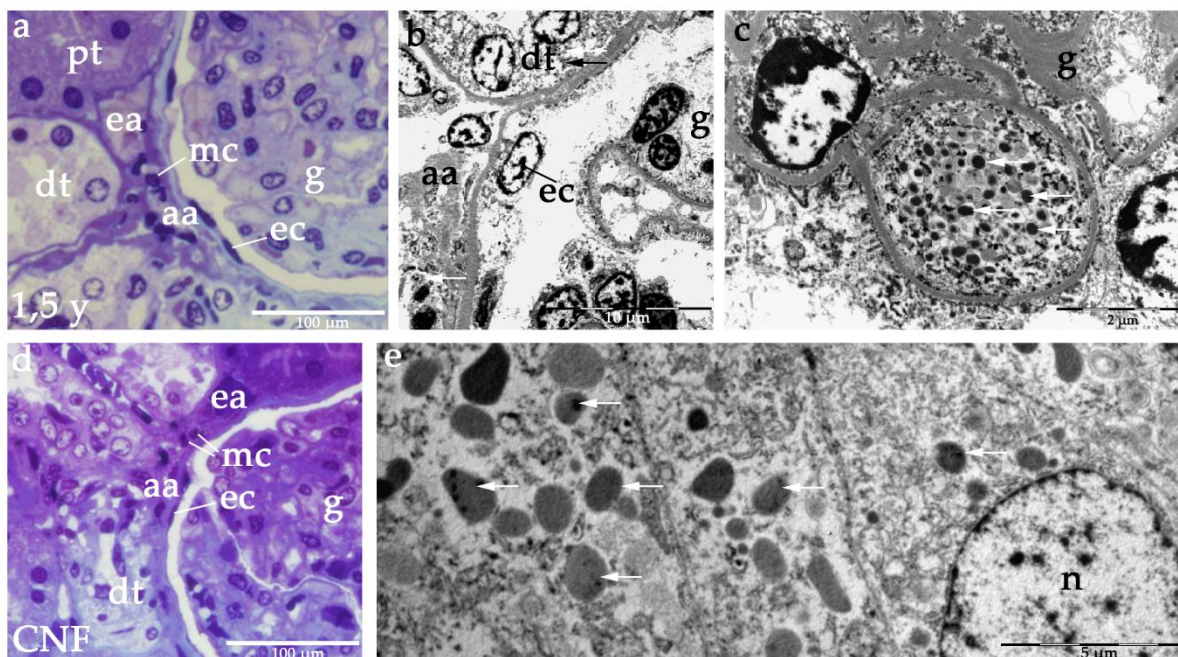
U CNF-u je ekspresija Cx37 također povećana u *maculi densi*, dovodnoj arterioli i nekim glomerularnim i ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama (Slika 18Am-p) (131).

Izražaj Cx40 je snižen, a Cx43, Cx45 i Cx37 je povišen u JGA zahvaćenih glomerula u CNF-u, u usporedbi sa zdravim postnatalnim tkivom (Slika 18B). Pokazana je i povećana akumulacija zrnaca renina u JGA hipertrofičnih glomerula u CNF-u (Slika 18A), dok mali i sklerotični glomeruli nisu pokazali izražaj renina u JGA (131).

## **5.5 Polu-tanki rezovi i elektronska mikroskopija renina u zdravim postnatalnim bubrezima i CNF-u**

JGA zdravih postnatalnih bubrega izgrađuju dovodna i odvodna arteriola, dio distalnog kanalića s *maculom densom* i ekstraglomerularne mezangijske stanice (Slika 19a). Elektronskim mikroskopom je uočena prisutnost zrnaca renina u dovodnoj arterioli i distalnim kanalićima (Slika 19b), ali i unutar glomerula (Slika 19c) (131).

JGA bubrega zahvaćenih CNF-om sastoji se od istih struktura, s tim da ima više mezangijskih stanica (Slika 19d). Veća akumulacija renina u CNF bubrezima je uočena u distalnim kanalićima (Slika 19e) (131).

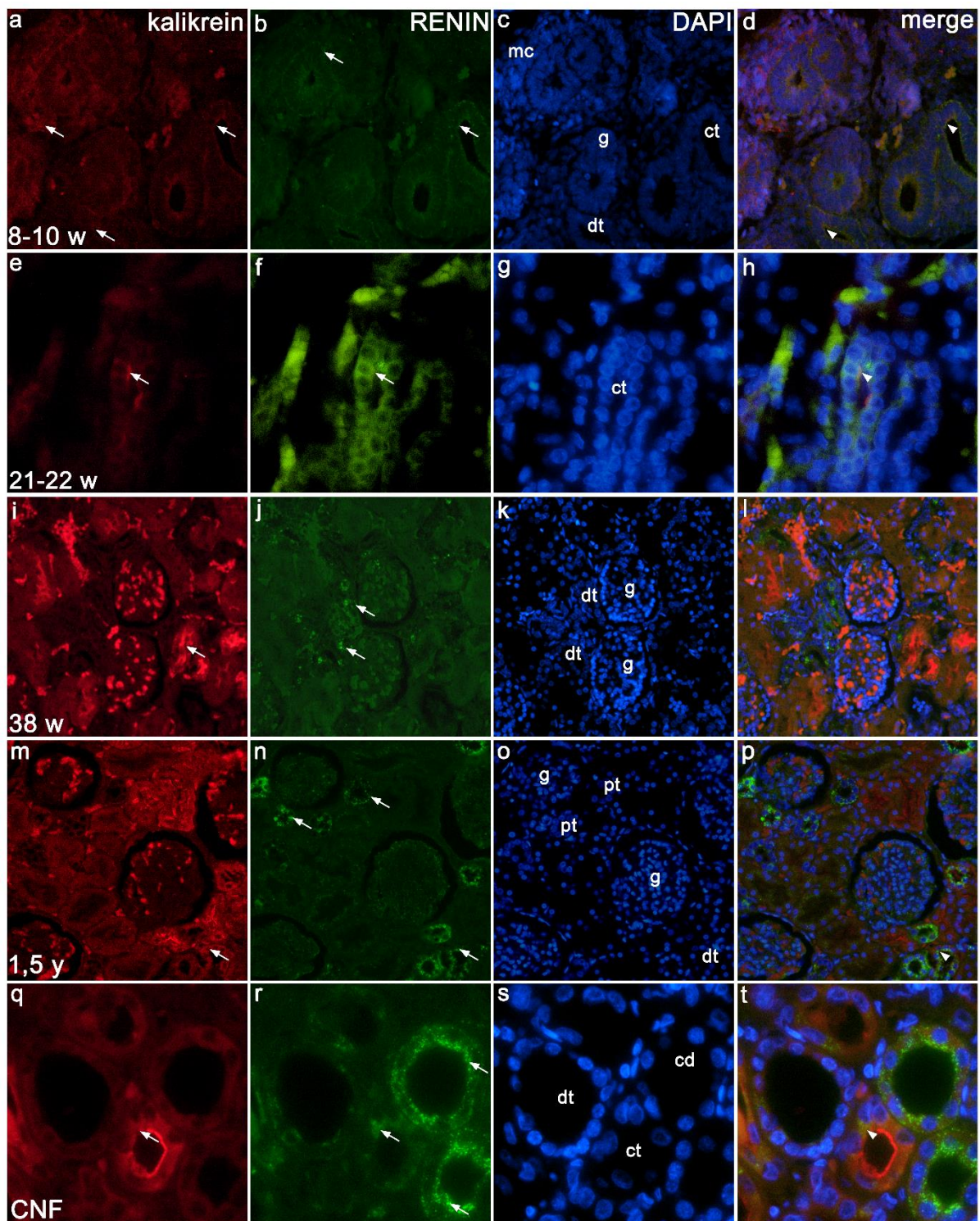


**Slika 19. Polu-tanki rezovi bojani toluidinskim modrilom (a,d) i elektronska mikroskopija (b,c,e) JGA zdravih i CNF postnatalnih bubrega.** Zdravi postnatalni bubregi (a,b,c) pokazuju karakteristične komponente JGA: distalni zavijeni kanalić (dt), proksimalni zavijeni kanalić (pt), dovodna arteriola (aa), odvodna arteriola (ea), ekstraglomerularne mezangijske stanice (mc), glomeruli (g), parijetalne epitelne stanice (ec). Reninska zrnca (strelice) u dt i aa te u glomerularnim stanicama (c). JGA bubrega zahvaćenih CNF-om pokazuju iste strukture (d,e). Guste nakupine reninskih zrnaca u *maculi densi* bubrega zahvaćenih CNF-om vidi se elektronskom mikroskopijom (e). Mjerilo: 100 (a,d), 10 µm (b), 2 µm (c), 5 µm (e).

### 5.6 Dvostruka imunofluorescencijska metoda za usporedbu izražaja renina i kalikreina u prenatalnom i postnatalnom tkivu ljudskog bubrega te u bubrezima zahvaćenim CNF-om

Tijekom ranog razvoja, ekspresija kalikreina je prisutna u metanefričkoj kapi, nefronima S-oblika, nezrelim glomerulima i sabirnim cijevima. U kasnijem razvoju, kalikrein je izražen u distalnim kanalićima i sabirnim cijevima, a najjače u sabirnim kanalićima, dok je renin izražen u istim strukturama. Ko-ekspresija kalikreina i renina je prisutna u malim područjima distalnih kanalića i sabirnih kanalića. U bubrezima zahvaćenim CNF-om ekspresija kalikreina u sabirnim kanalićima raste (Slika 20).





**Slika 20.** Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje renina i kalikreina u prenatalnim te u postnatalnim zdravim i CNF bubrezima. Bubrezi ljudskog embrija u 8.-10.tjednu razvoja (**a-d**); bubrezi ljudskog fetusa u 21-22. tjednu razvoja (**e-h**); bubrezi ljudskog fetusa 38. tjedna razvoja (**i-l**); postnatalno tkivo bubrega (1,5 godina) (**m-p**); tkivo bubrega zahvaćenog CNF-om (**q-t**). Legenda: ekspresija kalikreina i renina (strelice), metanefrička kapa (mc), sabirni

kanalići (ct), glomeruli (g), proksimalni zavijeni kanalići (pt), distalni zavijeni kanalići (dt). DAPI bojanje jezgara (**c, g, k, o, s**). Preklopljenje mikrofotografije (merge) pokazuju ko-ekspresiju renina i kalikreina (vrhovi strelica). Povećanje: (**a-d, i-l, m-p**) x40; (**e-h, q-t**) x100.

## **6. RASPRAVA**

Koneksini su transmembranski proteini koji formiraju tijesne spojeve (nexus) jako važne za održavanje bubrežne hemodinamike s obzirom na njihovu djelomičnu lokalizaciju u zidu krvnih žila. Međutim, koneksini imaju bitnu ulogu i u razvoju bubrega, oblikovanju i diferencijaciji tkiva te uspostavljanju funkcije glomerula i proksimalnih i distalnih bubrežnih kanalića (132). To nam ukazuje na važnost saznanja o prostorno-vremenskoj ekspresiji koneksina u prenatalnom razvoju, o čemu su do sada brojne eksperimentalne studije pokazale oprečne rezultate. Izražaj koneksina smo pratili paralelno s izražajem bjelančevina renina, sinaptopodina, nefrina, CD31,  $\alpha$ -SMA i kalikreina, koji su odgovorni za razvoj pojedinih bubrežnih struktura i stanica te se nadopunjuju s koneksinima. Određene stanice u bubrežima, kao što su reninske stanice, imaju mogućnost povratka u svoje prethodne oblike (prekursore) te diferencijacije u neke druge stanične oblike s kojima su povezane tijesnim spojevima (5, 101, 102). To podržava ideju o njihovoj mogućoj ulozi u liječenju nekih bubrežnih bolesti koje dovode do KBB. Stoga smo istražili izražaj ovih bjelančevina i u nefrotskom sindrom Finskog tipa i usporedili ga s izražajem u postnatalnom zdravom bubrežnom tkivu.

### **6.1 Važnost pojedinih koneksina u razvoju nefrona zdravih bubrega, funkciji postnatalnih bubrega te u bubrežima s CNF-om**

Izražaj Cx45 u glomerulima tijekom prenatalnog razvoja je pokazao silazni trend, dok je jaki izražaj Cx45 u proksimalnim kanalićima bio stalan tijekom razvoja kao i u postnatalnom razdoblju. Suprotno navedenom, eksperimentalna razvojna studija na miševima je pokazala da se izražaj Cx45 javlja usporedno s pojavom stanica koje proizvode renin, ali da postnatalno nema dokazanog izražaja ovog koneksina (75). Ekspresija Cx45 i Cx40 koju smo pokazali u glomerularnim mezangijskim stanicama i zrnatim stanicama, upućuje na postojanje heterotipnih kanala u tim stanicama, što je opisivano i u eksperimentalnih životinja (72, 75, 133). Korištenje različitih tehnika u studijama koje su analizirale izražaj koneksina dovelo je do suprotstavljenih zaključaka. Naime, izražaj Cx45 je bio dokazan u distalnim kanalićima miša imunohistokemijskom metodom (71), ali nije dokazana njegova mRNA RT PCR-om (84). U usporedbi sa zdravim postnatalnim bubrežima, promijenjena raspodjela Cx45 u proksimalnim kanalićima u CNF bubrežima može biti povezana s pogrešnim staničnim signaliziranjem koje dovodi do poremećene funkcije stanica proksimalnih kanalića s posljedičnom pojavom proteinurije. Prethodna istraživanja pokazala su da su CNF-u histopatološki svojstvene promjene u primarnoj ciliji na površini epitelnih stanica proksimalnih kanalića te pojava cista u proksimalnim kanalićima (35).



U ranom prenatalnom razvoju uočili smo slabi izražaj Cx43 u različitim strukturama bubrega, što se tijekom razvoja postepeno mijenjalo u smislu povećanog rasta ekspresije do umjerenog, ali samo u distalnim kanalićima. U glomerulima i proksimalnim kanalićima postnatalnih zdravih bubrega izražaj Cx43 bio je blago pojačan, dok u distalnim kanalićima bubrega s CNF-om izražaj Cx43 postaje nepravilno raspoređen i jak. Suprotno našim rezultatima, prethodne studije na humanom fetalnom tkivu bubrega nisu pokazale ekspresiju Cx43 u stanicama metanefričke kape (86), što bi se moglo objasniti boljom osjetljivošću imunofluorescencijskih protutijela korištenih u našoj studiji. Suprotstavljeni rezultati u eksperimentalnim studijama o izražaju Cx43 i Cx45 mogu se objasniti razlikama između različitih životinjskih vrsta korištenih u pojedinim studijama (69). U našoj studiji, u usporedbi sa Cx45, ekspresija Cx43 je bila ograničena samo na apikalni citoplazmatski dio epitelnih stanica kanalića nefrona, dok je ko-ekspresija Cx43/Cx45 uočena u istim stanicama, ali u različitim dijelovima citoplazme mezangijskih stanica, podocita i parijetalnih epitelnih stanica. Naša studija je također pokazala da Cx43 i Cx45 ko-lokaliziraju s markerima za nožice podocita (sinaptopodinom i nefrinom), što upućuje na važnost tih koneksina u diferencijaciji podocita. Prethodno je pokazano da je dediferencijacija ljudskih podocita u CNF bubrezima povezana s promjenama u organizaciji citoskeleta, prisutnosti primarne cilije i izražaju nestina (27, 28). Uz navedeno, interakcije između koneksina smatraju se neophodnim u regulaciji EMT-a razvojnih bubrežnih stanica, što se čini da je poremećeno u CNF-u (134).

Studije na životinjama pokazale su da je Cx43 primarno uključen u kontrolu pokretljivosti krvnih žila, ali ima funkciju i u transkripciji gena, otpuštanju ATP-a, dinamici citoskeleta i staničnom stresu (58). Studija KBB je pokazala da delecija Cx43 gena uzrokuje protuupalni efekt i smanjuje intersticijsku fibrozu, dok poremećaj u izražaju Cx43 dovodi do poravnavanja nožica podocita (135), što kao i naša studija ukazuje na važnost međudodosa koneksina i citoskeletnih proteina. Za usporedbu, pojačan izražaj Cx43 potiče proupalni okoliš što navodi na zaključak da promjene u ekspresiji koneksina mogu biti povezane s razvojem KBB (125, 126).

Umjerena do jaka ekspresija Cx37 u ljudskim bubrežnim strukturama tijekom razvoja svojstvena je i postnatalnom periodu. Takva reaktivnost je prisutna primarno u distalnim dijelovima nefrona, a slične zaključke donose i prethodne studije na životinjskim modelima (69). Tako je utvrđena važnost rane ekspresije Cx37 i Cx43 za razvoj bubrega, a porast izražaja navedenih koneksina je zabilježen i u neonatalnoj unilateralnoj opstrukciji mokraćovoda (84). U bubrezima zahvaćenim CNF-om, primijetili smo ukupan porast ekspresije Cx40 i Cx37, a osobito u distalnim kanalićima.

Umjerena do jaka reaktivnost Cx40 prisutna tijekom razvoja, u postnatalnim se bubrezima smanjivala u glomerulima i povećavala u distalnim kanalićima. Suprotno našim rezultatima, ekspresija Cx40 u štakora je opažena u glomerularnim i ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama, kao i neglomerularnim endotelnim stanicama (127).

Ko-ekspresija različitih koneksina s markerima za endotelne stanice (CD31) i glatke mišićne stanice stijenke krvnih žila ( $\alpha$ -SMA) u ljudskim bubrezima tijekom razvoja, pokazala je važnost komunikacije između tih dviju staničnih populacija u očuvanju integriteta zida krvnih žila.

U našem istraživanju, ukupan intenzitet signala Cx37, Cx40 i Cx43 je imao najveće vrijednosti u 22. tjednu razvoja i pratio je process nefrogeneze tj. nastanka novih nefrona, dok bi najviši intenzitet signala za Cx45 u 38. tjednu razvoja mogao biti povezan s periodom funkcionalnog sazrijevanja nefrona (136, 137). S obzirom na istraženu prostorno-vremensku ekspresiju koneksina u glomerulskim stanicama i stanicama bubrežnih kanalića tijekom razvoja ljudskog bubrega, smatramo da bi Cx45 mogao imati važnu ulogu u diferencijaciji proksimalnih kanalića, a Cx37, Cx40 i Cx43 u diferencijaciji distalnih kanalića. Također, fina citoplazmatska ravnoteža u ko-ekspresiji koneksina Cx43 i Cx45 mogla bi biti neophodna za diferencijaciju populacije glomerularnih stanica, uključujući podocyte, mezangijske stanice i parijetalne epitelne stanice. Naše je istraživanje pokazalo izrazite promjene u ekspresiji koneksina u svim bubrežnim strukturama tijekom razvoja, u postnatalnim i bubrezima s CNF-om, što upućuje na to da bi koneksini mogli biti sredstvo u liječenju bubrežnih bolesti (127). Naime, promjene u tijesnim spojevima (nexusima) povezane su sa strukturnim i funkcionalnim nepravilnostima u nekoliko bubrežnih bolesti (125-127). Mi smo opisali da u bubrezima zahvaćenim CNF-om dolazi do nagomilavanja miofibroblasta koji ko-lokaliziraju s Cx40 u intersticiju, što upućuje na moguću ulogu Cx40 u procesu regeneracije (138). Naime, povećani broj miofibroblasta dovodi do povećanog stvaranja intersticijskog matriksa, što je ključna karakteristika bubrežne fibroze u KBB. U prethodnim istraživanjima, neki dediferencirani bubrežni fibroblasti su pokazali izražaj mezenhimalnih markera (vimentin, dezmin, SMA, fibroblast-specifični-protein) što bi moglo biti znak EMT (120, 139). To daje naslutiti da bi liječenje koje bi ponovno uspostavilo fenotip zrelog fibroblasta moglo biti opcija liječenja bubrežne fibroze (120, 140).

## 6.2 Važnost koneksina u razvoju JGA i kontroli arterijskog tlaka

Naša studija je pokazala da već u osmom razvojnog tjednu dolazi do stvaranja jukstaglomerularnog područja diferencijacijom jukstaglomerularnih stanica u aferentnoj arterioli, stanica u distalnom kanaliću (*macula densa*) i ekstraglomerularnom mezangiju.

Ova se područja histološki prepoznaju intenzivnijim nakupljanjem renina u odnosu na ostala područja bubrežnog tkiva.

Krajem embrionalnog razdoblja, različiti koneksini su prisutni u strukturama JGA, a osobito jaka ekspresija je uočena za Cx40, dok Cx37, Cx43 i Cx45 pokazuju manje intenzivnu reaktivnost. Tijekom kasnijeg prenatalnog razvoja, izražaj Cx40 se smanjuje dok izražaj ostalih istraživanih koneksina raste te je u postnatalnom periodu jači od Cx40. Navedeni rezultati ukazuju na važnost koneksina, osobito Cx40, u razvoju JGA u prenatalnom periodu. Osim koneksina, uočili smo važnost nakupljanja renina tijekom diferencijacije JGA. Najveći izražaj renina u JGA je bio u postnatalnom razdoblju, kada dolazi do uspostave kontrole krvnog tlaka. Brojne studije su pokazale da renin i koneksini sudjeluju u održavanju homeostaze i normalnih bubrežnih funkcija (5, 44, 141). Međutim, studije o izražaju koneksina i renina u JGA, osobito tijekom razvoja, dovele su do oprečnih zaključaka.

U našem istraživanju, reninske stanice su tijekom ranog razvoja bile raspršene po tkivu bubrega (posebice u stijenkama krvnih žila), no daljnjim razvojem bubrega došlo je do njihove postepene lokalizacije u JGA što upućuje na njihovu ulogu u diferencijaciji JGA. Slična saznanja su opisana i u prethodnim studijama na ljudskom tkivu te životinjskim modelima (88, 94). U studiji na štakorima, bubrežna mRNA je dokazana na vaskularnom polu jukstamedularnih glomerula i uzduž aferentne, interlobularne i lučne (arkuatne) arterije (142). Prisutnost reninskih granula, osim u JG stanicama i nakratko u mezenhimalnim stanicama razvojnih bubrega, u našoj studiji je opisana i u stanicama distalnih kanalića, što je podatak koji izostaje u dosadašnjim studijama. Jedno od rijetkih istraživanja na fetalnom ljudskom tkivu je studija Minutha i suradnika koja opisuje izražaj renina u interlobularnim bubrežnim arterijama već prije pojave renina u drugim organima (88). Mi smo opisali izražaj renina prvenstveno u JGA tijekom ranog embrionalnog razvoja, ali obje studije pokazuju povećanje reaktivnosti renina nakon rođenja. U drugoj studiji na embrionalnom i fetalnom tkivu Schutza i suradnika, renin je uočen u JGA i arterijama neposredno uz glomerul. Navedeni autori ipak nisu uspjeli dokazati prisutnost zrnaca renina u distalnim kanalićima, osobito *maculi densi*, što je naša studija pokazala (88, 143).

U našem istraživanju pokazali smo da u bubrežima zahvaćenim CNF-om dolazi do smanjenog izražaja Cx40 u JGA u usporedbi s postnatalnim zdravim bubrežima. Najveća ekspresija je zabilježena za Cx43, a potom za Cx37 i Cx45. Povećano nakupljanje renina u hipertrofičnim glomerulima CNF bubrega može se objasniti kao kompenzacija izostanka ekspresije renina u sklerotičnim glomerulima. Ekspresija renina i koneksina u ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama u JGA bubrega zahvaćenih CNF-om ukazuje na moguće ponovno uspostavljanje njihovog embrionalnog uzorkovanja u patološkim stanjima kao što je KBB uzrokovana CNF-om. Smatra se da te stanice imaju kao jednu od mogućnosti diferencijacije proizvodnju renina u stanjima ugrožene bubrežne homeostaze, što je i ranije opisano u studiji na eksperimentalnim životinjama (96). Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su pojavu povećane aktivacije RAS-a u stanjima ugrožene homeostaze (87), pa tako i tijekom prijelaza iz akutne u kroničnu bubrežnu bolest (129) te drugim bubrežnim bolestima kojima je svojstvena fibroza i hipertrofija (39, 144). Slično našim rezultatima, studija na ljudskim bubrežima također je pokazala izražaj Cx37, Cx40 i Cx43 u ekstraglomerularnom mezangiju u JGA (145), dok isti autor u studiji na razvojnim i odraslim mišjim bubrežima, opisuje samo ko-ekspresiju Cx40 i renina (75). Druge eksperimentalne studije pokazale su premještanje stanica koje proizvode renin u ekstraglomerularni mezangij u odsustvu Cx40 (74), a u miševa koji nemaju izražaj Cx40, stanice koje proizvode renin bile su disfunkcionalne (146, 147). Nasuprot navedenom, u studiji na miševima koji nisu imali gen za Cx37, bubrezi nisu pokazali nikakvu promjenu u ekspresiji i aktivnosti stanica koje proizvode renin (73). Istraživanja koja opisuju izražaj Cx43 pokazala su oprečne rezultate: dok kod studija na miševima nema nikakvih dokaza o promjeni reninskih stanica u odsustvu Cx43 (148), istraživanje na hipertenzivnim miševima donosi podatke o važnosti ovog koneksina u izlučivanju renina (149). Oprečni rezultati u različitim studijama mogu biti povezani s razlikama između istraživanih vrsta ili različitom znanstvenom metodologijom korištenom u pojedinoj studiji. Razlike u rezultatima istraživanja među različitim vrstama uočene u usporednim studijama dodatno dokazuju važnost studija na ljudskom tkivu.

Naša istraživanja na ljudskim bubrežima pokazala su da Cx40 vjerojatno ima bitnu ulogu u oblikovanju JGA tijekom razvoja, dok ostali koneksini (Cx37, Cx43 i Cx45) preuzimaju tu ulogu u postnatalnom periodu. Koneksini imaju važnu ulogu i u patološkim stanjima kao što je CNF. Naime, pokazano je da Cx40 može biti zamijenjen sa Cx45 u stanjima ugroze bubrežne funkcije (76), a mi smo opisali blagi porast Cx45 u CNF bubrežima koji bi mogao imati kompenzatornu ulogu.

U usporedbi sa zdravim postnatalnim bubrezima, bubrezi zahvaćeni CNF-om također pokazuju pojačanu ekspresiju Cx37, Cx43 i Cx45 u JGA hipertrofičnih glomerula, dok se ekspresija Cx40 smanjivala. Uz navedeno, zrnca renina u JGA CNF-bubrega su dodatno bila prisutna i u ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama, što ukazuje na njihov povratak u embrionalni program pre-reninskih stanica. Ko-ekspresija koneksina i renina u razvojnim, postnatalnim i CNF ljudskim bubrezima ukazuje na to da Cx40 primarno kontrolira oblikovanje JGA, a Cx37, Cx43 i Cx45 imaju funkciju u postnatalnom signaliziranju unutar JGA i održavanju bubrežne homeostaze i kontroli arterijskog tlaka.

## **7. ZAKLJUČAK**

Istraživanje prostorno-vremenskog izražaja koneksina, renina, sinaptopodina, nefrina, CD31,  $\alpha$ -SMA i kalikreina je dovelo do nekoliko važnih spoznaja.

1/ Ko-ekspresija Cx43/Cx45 je uočena u različitim dijelovima istih stanica unutar nefrona (proksimalnih i distalnih kanalića) i glomerula (mezangijskih, parijetalnih epitelnih stanica i podocita). Prostorno-vremenska ekspresija koneksina u kanalićima nefrona ljudskog bubrega ukazuje na važnost Cx45 u diferencijaciji proksimalnih kanalića, a Cx37, Cx40 i Cx43 u diferencijaciji distalnih kanalića.

2/ Cx43 i Cx45 su pokazali i ko-lokalizaciju s markerima podocita (sinaptopodinom) i *slit*-membrane (nefrinom), što upućuje na njihovu važnost u međusobnoj komunikaciji i diferencijaciji podocita, kao i u komunikaciji sa susjednim stanicama.

3/ Promatrajući ukupan intenzitet signala Cx37, Cx40 i Cx43 u prenatalnom bubrežnom tkivu, njihove najveće vrijednosti uočene su u 22. tjednu, a njihov porast tijekom najintenzivnijeg razdoblja nefrogenze. Maksimalan intenzitet signala Cx45 uočen je u 38. tjednu, tijekom razdoblja funkcionalnog sazrijevanja nefrona.

4/ Ko-ekspresija koneksina s markerima za endotelne stanice (CD31) i glatke mišićne stanice krvnih žila ( $\alpha$ -SMA) u razvojnim ljudskim bubrezima pokazuje važnost komunikacije između endotelnih stanica i glatkih mišićnih stanica u svrhu očuvanja integriteta zida krvnih žila te ulogu koneksina u normalnom razvoju bubrežnih krvnih žila.

5/ Prostorno-vremenski izražaj Cx40 upućuje na njegovu ključnu ulogu u razvoju JGA, dok Cx37, Cx43 i Cx45 preuzimaju tu ulogu postnatalno, uključujući se u kontrolu arterijskog tlaka.

6/ Pojačan izražaj navedenih koneksina pokazan je i u hipertrofičnim glomerulima bubrega zahvaćenih CNF-om. Također je uočena ko-lokalizacija Cx40 i nagomilanih miofibroblasta u intersticiju što upućuje na ulogu Cx40 u procesu regeneracije i fibroze. Obzirom da je dediferencijacija podocita jedno od potencijalnih objašnjenja nastanka CNF-a, ovaj podatak nas dovodi korak bliže mogućnosti liječenja nefrotskog sindroma koji postupno dovodi do kronične bolesti bubrega.

7/ Zrnca renina se javljaju u JGA već tijekom ranog razvoja bubrega, a izražaj se povećava u postnatalnom razdoblju. Reninska zrnca u bubrezima zahvaćenim CNF-om su izražena i u ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama što ukazuje na njihov povratak u prethodne embrionalne stadije (tzv. prerenske stanice) i potencijalno još jednu mogućnost ciljanog liječenja KBB.

8/ Elektronskom mikroskopijom zdravih postnatalnih bubrega zrnca renina su uočena u dovodnoj arterioli, distalnim kanalićima i unutar glomerula, dok je u bubrezima zahvaćenim

CNF-om uočena veća količina zrnaca renina u distalnim kanalicićima nego u zdravim bubrezima. Povećane razine Cx37, Cx43 i Cx45 u CNF-bubrezima ko-lokaliziraju s reninskim stanicama.

9/ U bubrezima zahvaćenim CNF-om uočen je ukupan porast Cx40 i Cx37, osobito u distalnim kanalicićima. Promjena raspodjele signala Cx45 u proksimalnim kanalicićima u CNF-u može rezultirati pogrešnim staničnim signaliziranjem i posljedičnom proteinurijom.

10/ Statističkom analizom smo pokazali značajnost razlike vrška intenziteta (peak) signala u 22. tjednu za Cx37 ( $P=0.0003$ ), Cx43 ( $P=0.02$ ) i Cx40 ( $P<0.0001$ ). Vršak signala Cx45 u 38. tjednu se također pokazao značajnim ( $P=0.03$ ).

Linearni trend izražaja ispitivanih koneksina u JGA se pokazao statistički značajnim za Cx40 ( $R^2=97.82\%$ ,  $P=0.01$ ) i Cx45 ( $R^2=93.56\%$   $P=0.0328$ ).

Ukupni izražaj renina u JGA je pokazao značajan eksponencijalni rast tijekom razvoja ( $R^2=99.64\%$   $P=0.0018$ ).

11/ U kasnom prenatalnom razdoblju ko-ekspresija kalikreina i renina je prisutna u malim područjima distalnih kanalića i sabirnih kanalića, a ekspresija kalikreina raste u sabirnim kanalicićima u bubrezima zahvaćenim CNF-om.

12/ Prostorno-vremenska ekspresija Cx i renina, te ostalih istraživanih razvojnih čimbenika ukazuje na njihovu moguću ulogu u normalnom razvoju pojedinih segmenata nefrona, staničnih populacija u glomerulu, razvoju krvnih žila bubrega te kontroli krvnog tlaka.



## **8. SAŽETAK**

Analiziran je prostorno-vremenski izražaj koneksina (Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45), renina, sinaptopodina, nefrina, CD31 i  $\alpha$ -SMA u nefronima i JGA ljudskih prenatalnih zdravih bubrega, postnatalnih zdravih bubrega te u bubrezima s nefrotskim sindromom Finskog tipa (CNF). U istraživanju su korištene tehnike dvostruke imunofluorescencije, elektronske mikroskopije i statističkog mjerenja površina ispod krivulje (AUC) histograma intenziteta fluorescencije.

Tijekom razvoja bubrega, Cx45 pokazuje jaku ekspresiju u proksimalnim bubrežnim kanalićima, dok su Cx37 i Cx40 umjereno do jako izraženi u distalnom dijelu nefrona. U glomerulima, Cx43 i Cx45 ko-lokaliziraju u podocitima, mezangijskim stanicama i parijetalnim epitelnim stanicama, kao i s biljezima za podocyte (sinaptopodin, nefrin). Različiti koneksini također pokazuju i ko-ekspresiju s endotelnim (CD31) i glatkim-mišićnim ( $\alpha$ -SMA) biljezima u zidu krvnih žila. Cx37, Cx40 i Cx43 imaju najjači intenzitet tijekom razdoblja koje prati nefrogenezu, dok je najveći intenzitet signala za Cx45 povezan sa sazrijevanjem nefrona. S obzirom na navedeno prostorno-vremensko uzorkovanje, Cx45 vjerojatno ima ulogu u diferencijaciji proksimalnih kanalića, a Cx37, Cx40 i Cx43 u diferencijaciji distalnih kanalića. Tijekom razvoja bubrega, jaka ekspresija Cx40 u JGA postupno opada, dok ekspresija Cx37, Cx43 i Cx45 raste te se nastavlja i u postnatalnom razdoblju. Bubrezi zahvaćeni CNF-om pokazuju pojačan izražaj Cx43 u distalnim kanalićima, promijenjeni citoplazmatski raspored Cx45 u proksimalnim kanalićima te ukupan porast ekspresije Cx40 i Cx37. U CNF-bubrezima Cx40 ko-lokalizira sa brojnim intersticijskim miofibroblastima. Povećane razine Cx37, Cx43 i Cx45 u CNF-bubrezima ko-lokaliziraju s reninskim stanicama. Reninske stanice u KBB uzrokovanom CNF-om javljaju se i u ekstraglomerularnim mezangijskim stanicama, što ukazuje na njihov povratak u prethodne embrionalne stadije kao posljedica pokušaja kompenzacije oštećenja bubrežnog tkiva. Cx40 vjerojatno ima važnu ulogu u diferencijaciji JGA tijekom razvoja bubrega, dok Cx37, Cx43 i Cx45 održavaju pravilnu bubrežnu funkciju u postnatalnom razdoblju. Naše istraživanje pokazuje važnu ulogu koneksina u nefrogenezi, diferencijaciji glomerularnih stanica, razvoju krvnih žila i kontroli arterijskog tlaka, kako u zdravom bubrežnom tkivu tako i u CNF-u.

## **9. SUMMARY**

Our study analyzed the spatio-temporal patterning of connexins (Cx37, Cx40, Cx43 and C45), renin, synaptopodin, nephrin, CD31 and  $\alpha$ -SMA in the nephron and JGA of developing, postnatal healthy human kidneys and in the nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF). For data analysis we used double immunofluorescence, electron microscopy and statistical measuring of area under curve (AUC) of fluorescence intensity histograms.

During kidney development, strong expression of Cx45 characterized proximal tubules, while Cx37 and Cx40 showed moderate-to-strong expression in developing cells of distal nephron. In the glomeruli, Cx43 and Cx45 co-localized with markers for podocytes (synaptopodin, nephrin), with mesangial and parietal epithelial cells. Different connexins also showed co-expression with endothelial (CD31) and VSMC ( $\alpha$ -SMA) markers in vascular walls. Cx37, Cx40 and Cx43 peak in signalling intensity accompanied kidney nephrogenesis, while Cx45 peak signalling associated the nephron maturation. Based on the Cx spatio-temporal patterning, Cx45 is considered to be important in differentiation of proximal tubules, while Cx37, Cx40 and Cx43 in distal tubules cell differentiation. During kidney development, strong expression of Cx40 in the JGA gradually decreased, while the expression of Cx37, Cx43 and Cx45 increased and continued in the postnatal period as well. CNF kidneys showed increased Cx43 expression in distal tubules, disorganized cytoplasmic Cx45 expression in proximal tubules, and overall elevation of Cx40 and Cx37 in kidney tissue. In CNF-kidneys, Cx40 co-localized with abundant interstitial myofibroblasts. Increased levels of Cx37, Cx43 and Cx45 which co-localized with renin cells also characterized CNF kidneys. Renin cells in chronic kidney disease (CKD) caused by CNF reappeared in extraglomerular mesangial cells which could imply their return to embryonic patterning, which is compensatory to the damage of the kidney tissue. Cx40 probably has a significant role in the formation of the JGA in developing kidneys, while Cx37, Cx43 and Cx45 take over that role in postnatal maintenance of kidney function. Our study showed important role of Cxs in nephrogenesis, differentiation of glomerular cells, blood vessel development and blood pressure control in the healthy kidney tissue and in the CNF.

## **10. LITERATURA**

1. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J.* 1998;68(5):800, 3-16, 19-20; quiz 21-4.
2. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:317-25.
3. Yao J, Oite T, Kitamura M. Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(5):F939-46.
4. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Vukojevic K, Saraga M, Glavina Durdov M, et al. Spatio-temporal patterning of different connexins in developing and postnatal human kidneys and in nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF). *Sci Rep.* 2020;10(1):8756.
5. Gomez RA. Fate of Renin Cells During Development and Disease. *Hypertension.* 2017;69(3):387-95.
6. Sampaio FJ. Renal anatomy. Endourologic considerations. *Urol Clin North Am.* 2000;27(4):585-607, vii.
7. Lopez JI, Larrinaga G, Kuroda N, Angulo JC. The normal and pathologic renal medulla: a comprehensive overview. *Pathol Res Pract.* 2015;211(4):271-80.
8. Radi ZA. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *Int J Toxicol.* 2019;38(3):215-27.
9. Ichimura K, Sakai T. Evolutionary morphology of podocytes and primary urine-producing apparatus. *Anat Sci Int.* 2017;92(2):161-72.
10. Nagata M. Glomerulogenesis and the role of endothelium. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018;27(3):159-64.
11. Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Yoshioka T, et al. Redistribution of connexin43 expression in glomerular podocytes predicts poor renal prognosis in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(9):2472-7.
12. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol.* 2016;117:31-64.
13. Maddox DA, Gennari FJ. The early proximal tubule: a high-capacity delivery-responsive reabsorptive site. *Am J Physiol.* 1987;252(4 Pt 2):F573-84.
14. Subramanya AR, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(12):2147-63.
15. Staruschenko A. Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. *Compr Physiol.* 2012;2(2):1541-84.
16. Saraga-Babic M, Vukojevic K, Bocina I, Drnasin K, Saraga M. Ciliogenesis in normal human kidney development and post-natal life. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(1):55-63.
17. Sainio K, Raatikainen-Ahokas A. Mesonephric kidney--a stem cell factory? *Int J Dev Biol.* 1999;43(5):435-9.
18. Cullen-McEwen L, Sutherland MR, Black MJ. The Human Kidney: Parallels in Structure, Spatial Development, and Timing of Nephrogenesis. U: *Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration.* Little M. UK: Academic Press; 2016, str. 27-40.
19. Moritz KM, Wintour EM. Functional development of the meso- and metanephros. *Pediatr Nephrol.* 1999;13(2):171-8.
20. Davies JA. Morphogenesis of the metanephric kidney. *ScientificWorldJournal.* 2002;2:1937-50.
21. Carev D, Krnic D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babic M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(5):627-36.
22. Carev D, Saraga M, Saraga-Babic M. Involvement of FGF and BMP family proteins and VEGF in early human kidney development. *Histol Histopathol.* 2008;23(7):853-62.

23. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev.* 2000;92(1):31-45.
24. Trueb B, Amann R, Gerber SD. Role of FGFRL1 and other FGF signaling proteins in early kidney development. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(14):2505-18.
25. Upadhyay KK, Silverstein DM. Renal development: a complex process dependent on inductive interaction. *Curr Pediatr Rev.* 2014;10(2):107-14.
26. Nishinakamura R, Sharmin S, Taguchi A. Induction of nephron progenitors and glomeruli from human pluripotent stem cells. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(2):195-200.
27. Vukojevic K, Raguz F, Saraga M, Filipovic N, Bocina I, Kero D, et al. Glomeruli from patients with nephrin mutations show increased number of ciliated and poorly differentiated podocytes. *Acta Histochem.* 2018;120(8):748-56.
28. Filipovic N, Vukojevic K, Bocina I, Saraga M, Durdov MG, Kablar B, et al. Immunohistochemical and electronmicroscopic features of mesenchymal-to-epithelial transition in human developing, postnatal and nephrotic podocytes. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(4):481-95.
29. Kurtzeborn K, Cebrian C, Kuure S. Regulation of Renal Differentiation by Trophic Factors. *Front Physiol.* 2018;9:1588.
30. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, Kishi S, Valerius MT, Bonventre JV. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol.* 2015;33(11):1193-200.
31. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, et al. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell stem cell.* 2014;14(1):53-67.
32. Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development.* 2009;136(23):3863-74.
33. Saxen L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol.* 1987;1(3):385-92.
34. Saint-Faust M, Boubred F, Simeoni U. Renal development and neonatal adaptation. *Am J Perinatol.* 2014;31(9):773-80.
35. Saraga M, Vukojevic K, Krzelj V, Puretic Z, Bocina I, Durdov MG, et al. Mechanism of cystogenesis in nephrotic kidneys: a histopathological study. *BMC Nephrol.* 2014;15:3.
36. Hochane M, van den Berg PR, Fan X, Berenger-Currias N, Adegeest E, Bialecka M, et al. Single-cell transcriptomics reveals gene expression dynamics of human fetal kidney development. *PLoS Biol.* 2019;17(2):e3000152.
37. Ryan D, Sutherland MR, Flores TJ, Kent AL, Dahlstrom JE, Puelles VG, et al. Development of the Human Fetal Kidney from Mid to Late Gestation in Male and Female Infants. *EBioMedicine.* 2018;27:275-83.
38. Racetin A, Juric M, Filipovic N, Solic I, Kosovic I, Glavina Durdov M, et al. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. *Croat Med J.* 2019;60(6):521-31.
39. Urushihara M, Kagami S. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of renal disease. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(9):1471-9.
40. Ishiyama H, Ishikawa A, Imai H, Matsuda T, Yoneyama A, Yamada S, et al. Spatial Relationship Between the Metanephros and Adjacent Organs According to the Carnegie Stage of Development. *Anat Rec (Hoboken).* 2019;302(11):1901-15.
41. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol.* 2012;2(3):1981-2035.
42. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1359-400.

43. Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(1):103-16.
44. Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, Ponsaerts R, D'Hondt C, Bultynck G, et al. Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1815(1):13-25.
45. Wei CJ, Xu X, Lo CW. Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:811-38.
46. Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(1):5-8.
47. Nalewajska M, Marchelek-Mysliwiec M, Opara-Bajerowicz M, Dziedziejko V, Pawlik A. Connexins-Therapeutic Targets in Cancers. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
48. Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science.* 1999;283(5405):1176-80.
49. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006;394(Pt 3):527-43.
50. Esseltine JL, Laird DW. Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 2016;26(12):944-55.
51. Vinken M, Decrock E, Leybaert L, Bultynck G, Himpens B, Vanhaecke T, et al. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):2002-8.
52. Valdebenito S, Lou E, Baldoni J, Okafo G, Eugenin E. The Novel Roles of Connexin Channels and Tunneling Nanotubes in Cancer Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
53. Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 2000;127(16):3501-12.
54. Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem.* 2003;10(19):2045-58.
55. Wagner C. Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int.* 2008;73(5):547-55.
56. Czyz J. The stage-specific function of gap junctions during tumorigenesis. *Cell Mol Biol Lett.* 2008;13(1):92-102.
57. Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell.* 1986;44(1):187-96.
58. Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR, Girao H. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication - gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci.* 2017;130(21):3619-30.
59. Moorby CD, Gherardi E. Expression of a Cx43 deletion mutant in 3T3 A31 fibroblasts prevents PDGF-induced inhibition of cell communication and suppresses cell growth. *Exp Cell Res.* 1999;249(2):367-76.
60. Seul KH, Kang KY, Lee KS, Kim SH, Beyer EC. Adenoviral delivery of human connexin37 induces endothelial cell death through apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(4):1144-51.
61. Schuster A, Oishi H, Beny JL, Stergiopoulos N, Meister JJ. Simultaneous arterial calcium dynamics and diameter measurements: application to myoendothelial communication. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(3):H1088-96.
62. Wang X, Veruki ML, Bukoreshtliev NV, Hartveit E, Gerdes HH. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(40):17194-9.
63. Hamelin R, Allagnat F, Haefliger JA, Meda P. Connexins, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Protein Pept Sci.* 2009;10(1):18-29.



64. Haefliger JA, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):345-56.
65. Simon AM, McWhorter AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol.* 2002;251(2):206-20.
66. Wong CW, Christen T, Roth I, Chadjichristos CE, Derouette JP, Foglia BF, et al. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med.* 2006;12(8):950-4.
67. Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, et al. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development.* 2000;127(19):4179-93.
68. Li L, Zhang W, Shi WY, Ma KT, Zhao L, Wang Y, et al. The enhancement of Cx45 expression and function in renal interlobar artery of spontaneously hypertensive rats at different age. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(1):52-65.
69. Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(5):R1143-55.
70. Stoessel A, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Connexin 37 is localized in renal epithelia and responds to changes in dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(1):F216-23.
71. Butterweck A, Gergs U, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells. *J Membr Biol.* 1994;141(3):247-56.
72. Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Kruger O, et al. Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R371-80.
73. Wagner C, Kurtz L, Schweda F, Simon AM, Kurtz A. Connexin 37 is dispensable for the control of the renin system and for positioning of renin-producing cells in the kidney. *Pflugers Arch.* 2009;459(1):151-8.
74. Kurtz L, Schweda F, de Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, et al. Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1103-11.
75. Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Connexin expression in renin-producing cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):506-12.
76. Schweda F, Kurtz L, de Wit C, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension. *Kidney Int.* 2009;75(5):482-9.
77. Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, et al. Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. *Kidney Int.* 2001;60(1):190-201.
78. Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney KR, Hill CE, et al. Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney Int.* 2008;73(4):415-22.
79. Zhang J, Hill CE. Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. *Kidney Int.* 2005;68(3):1171-85.
80. Kurtz A. Renal connexins and blood pressure. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):1903-8.
81. Hwan Seul K, Beyer EC. Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvasc Res.* 2000;59(1):140-8.
82. Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen T, Holstein-Rathlou NH. Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochem Cell Biol.* 2001;115(6):479-87.

83. Seul KH, Beyer EC. Mouse connexin37: gene structure and promoter analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1492(2-3):499-504.
84. Silverstein DM, Thornhill BA, Leung JC, Vehaskari VM, Craver RD, Trachtman HA, et al. Expression of connexins in the normal and obstructed developing kidney. *Pediatr Nephrol*. 2003;18(3):216-24.
85. Hieda K, Hayashi S, Kim JH, Murakami G, Cho BH, Matsubara A. Spatial relationship between expression of cytokeratin-19 and that of connexin-43 in human fetal kidney. *Anat Cell Biol*. 2013;46(1):32-8.
86. Raduly G, Pap Z, Denes L, Szanto A, Sipos TC, Pavai Z. The immunoexpression of aquaporin 1, PAX2, PAX8, connexin 36, connexin 43 in human fetal kidney. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):437-44.
87. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):363-82.
88. Schutz S, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol*. 1996;149(6):2067-79.
89. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86(3):747-803.
90. Mirabito Colafella KM, Bovee DM, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp Eye Res*. 2019;186:107680.
91. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(7):1093-6.
92. Gubler MC, Antignac C. Renin-angiotensin system in kidney development: renal tubular dysgenesis. *Kidney Int*. 2010;77(5):400-6.
93. Sequeira-Lopez ML, Nagalakshmi VK, Li M, Sigmund CD, Gomez RA. Vascular versus tubular renin: role in kidney development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309(6):R650-7.
94. Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int*. 2008;73(1):43-51.
95. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med*. 2004;116(4):263-72.
96. Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell*. 2004;6(5):719-28.
97. Stefanska A, Kenyon C, Christian HC, Buckley C, Shaw I, Mullins JJ, et al. Human kidney pericytes produce renin. *Kidney Int*. 2016;90(6):1251-61.
98. Shaw I, Rider S, Mullins J, Hughes J, Peault B. Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(8):521-34.
99. Sequeira Lopez ML, Gomez RA. Development of the renal arterioles. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(12):2156-65.
100. Yosypiv IV, Sequeira-Lopez MLS, Song R, De Goes Martini A. Stromal prorenin receptor is critical for normal kidney development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019;316(5):R640-R50.
101. Pippin JW, Sparks MA, Glenn ST, Buitrago S, Coffman TM, Duffield JS, et al. Cells of renin lineage are progenitors of podocytes and parietal epithelial cells in experimental glomerular disease. *Am J Pathol*. 2013;183(2):542-57.
102. Starke C, Betz H, Hickmann L, Lachmann P, Neubauer B, Kopp JB, et al. Renin lineage cells repopulate the glomerular mesangium after injury. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(1):48-54.
103. Nishiyama A, Kobori H. Independent regulation of renin-angiotensin-aldosterone system in the kidney. *Clin Exp Nephrol*. 2018;22(6):1231-9.

104. Quadri SS, Culver SA, Li C, Siragy HM. Interaction of the renin angiotensin and cox systems in the kidney. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2016;8:215-26.
105. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109(11):1417-27.
106. Reinhold SW, Kruger B, Barner C, Zoicas F, Kammerl MC, Hoffmann U, et al. Nephron-specific expression of components of the renin-angiotensin-aldosterone system in the mouse kidney. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012;13(1):46-55.
107. Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Pagan J, Kobori H, Seth DM, Casarini DE, et al. Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*. 2008;51(6):1590-6.
108. Rohrwasser A, Ishigami T, Gociman B, Lantelme P, Morgan T, Cheng T, et al. Renin and kallikrein in connecting tubule of mouse. *Kidney Int*. 2003;64(6):2155-62.
109. Pesquero JB, Bader M. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(9):1197-203.
110. Naffah-Mazzacoratti Mda G, Gouveia TL, Simoes PS, Perosa SR. What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? *World J Biol Chem*. 2014;5(2):130-40.
111. El-Dahr SS. Spatial expression of the kallikrein-kinin system during nephrogenesis. *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1301-10.
112. Emanuelli C, Madeddu P. Role of the kallikrein-kinin system in the maturation of cardiovascular phenotype. *Am J Hypertens*. 1999;12(10 Pt 1):988-99.
113. Kato T, Mizuno S. Nephron, Wilms' tumor-1 (WT1), and synaptopodin expression in developing podocytes of mice. *Exp Anim*. 2017;66(3):183-9.
114. Kwon SK, Kim SJ, Kim HY. Urine synaptopodin excretion is an important marker of glomerular disease progression. *Korean J Intern Med*. 2016;31(5):938-43.
115. Liu Z, Chang AN, Grinnell F, Trybus KM, Milewicz DM, Stull JT, et al. Vascular disease-causing mutation, smooth muscle alpha-actin R258C, dominantly suppresses functions of alpha-actin in human patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(28):E5569-E78.
116. Whitesell TR, Kennedy RM, Carter AD, Rollins EL, Georgijevic S, Santoro MM, et al. An alpha-smooth muscle actin (acta2/alphasma) zebrafish transgenic line marking vascular mural cells and visceral smooth muscle cells. *PLoS One*. 2014;9(3):e90590.
117. Newman DK, Hamilton C, Newman PJ. Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood*. 2001;97(8):2351-7.
118. Munro DAD, Hohenstein P, Davies JA. Cycles of vascular plexus formation within the nephrogenic zone of the developing mouse kidney. *Sci Rep*. 2017;7(1):3273.
119. Liu L, Shi GP. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2012;94(1):3-5.
120. Boor P, Floege J. The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3027-36.
121. Berody S, Heidet L, Gribouval O, Harambat J, Niaudet P, Baudouin V, et al. Treatment and outcome of congenital nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(3):458-67.
122. Holmberg C, Antikainen M, Ronnholm K, Ala Houhala M, Jalanko H. Management of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. *Pediatr Nephrol*. 1995;9(1):87-93.
123. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(3):133-46.

124. Prakoura N, Kavvadas P, Chadjichristos CE. Connexin 43: a New Therapeutic Target Against Chronic Kidney Disease. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):985.
125. Toubas J, Beck S, Pageaud AL, Huby AC, Mael-Ainin M, Dussaule JC, et al. Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(1):F24-32.
126. Abed A, Toubas J, Kavvadas P, Authier F, Cathelin D, Alfieri C, et al. Targeting connexin 43 protects against the progression of experimental chronic kidney disease in mice. *Kidney Int*. 2014;86(4):768-79.
127. Morioka T, Okada S, Nameta M, Kamal F, Yanakieva-Georgieva NT, Yao J, et al. Glomerular expression of connexin 40 and connexin 43 in rat experimental glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*. 2013;17(2):191-204.
128. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17088.
129. Chou YH, Chu TS, Lin SL. Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23 Suppl 4:121-5.
130. Hillis GS, Duthie LA, Mlynski R, McKay NG, Mistry S, MacLeod AM, et al. The expression of connexin 43 in human kidney and cultured renal cells. *Nephron*. 1997;75(4):458-63.
131. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Bocina I, Glavina Durdov M, Vukojevic K, et al. Connexin Signaling in the Juxtaglomerular Apparatus (JGA) of Developing, Postnatal Healthy and Nephrotic Human Kidneys. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
132. Abed AB, Kavvadas P, Chadjichristos CE. Functional roles of connexins and pannexins in the kidney. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(15):2869-77.
133. Rackauskas M, Kreuzberg MM, Pranevicius M, Willecke K, Verselis VK, Bukauskas FF. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45. *Biophys J*. 2007;92(6):1952-65.
134. Jose PA, Chen S, Armando I. Connections in chronic kidney disease: connexin 43 and connexin 37 interaction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(1):F21-3.
135. Matsuuchi L, Naus CC. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(1):94-108.
136. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, Locci A, Cabras T, et al. Marked interindividual variability in renal maturation of preterm infants: lessons from autopsy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23 Suppl 3:129-33.
137. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest*. 1991;64(6):777-84.
138. Gustafsson F, Mikkelsen HB, Arensbak B, Thuneberg L, Neve S, Jensen LJ, et al. Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol*. 2003;119(2):139-48.
139. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*. 2008;12(1):22-37.
140. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3981-90.
141. Aasen T, Johnstone S, Vidal-Brime L, Lynn KS, Koval M. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
142. Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, et al. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol*. 1989;257(5 Pt 2):F850-8.

143. Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, Rix E, Taugner R. Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat Embryol (Berl)*. 1981;162(2):173-81.
144. Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*. 2010;90(2):607-73.
145. Kurtz L, Madsen K, Kurt B, Jensen BL, Walter S, Banas B, et al. High-level connexin expression in the human juxtaglomerular apparatus. *Nephron Physiol*. 2010;116(1):p1-8.
146. Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A, Schweda F. Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res*. 2007;100(4):556-63.
147. de Wit C, Roos F, Bolz SS, Kirchhoff S, Kruger O, Willecke K, et al. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res*. 2000;86(6):649-55.
148. Gerl M, Kurt B, Kurtz A, Wagner C. Connexin 43 is not essential for the control of renin synthesis and secretion. *Pflugers Arch*. 2014;466(5):1003-9.
149. Haefliger JA, Krattinger N, Martin D, Pedrazzini T, Capponi A, Doring B, et al. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. *J Clin Invest*. 2006;116(2):405-13.

## **11. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNNE INFORMACIJE**

Ime i prezime: Ivona Kosović

Datum rođenja: 14.05.1993.

e-mail: [ivona.kosovic@gmail.com](mailto:ivona.kosovic@gmail.com)

## **OBRAZOVANJE**

- 1999.-2007. OŠ Gradac, Gradac
- 2007.-2011. Srednja škola fra Andrije Kačića Miošića u Pločama, opća gimnazija
- 2011.-2017. Medicinski fakultet Split Sveučilišta u Splitu, smjer Medicina
2017. doktorica medicine, diplomirala na temu: Trombotična mikroangiopatija u djece: uzroci, dijagnostika, liječenje, praćenje i ishod
2018. - Poslijediplomski doktorski studij Biologija novotvorina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

## **RADNO ISKUSTVO**

2017. - 2018. liječnik pripravnik, KBC Split
6. 2018.-9. 2018. liječnik u timu T1, Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije
2018. - asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

## **NASTAVNE AKTIVNOSTI**

2018. - Histologija i embriologija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2019. Izborni predmet: Hello kidney, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

## **OSTALE AKTIVNOSTI**

2018. Kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva, Šibenik, aktivni sudionik
2019. SpliTech konferencija, pasivni sudionik
2019. IPNA kongres, Venecija, aktivni sudionik
2019. GENuBiH kongres, Sarajevo, aktivni sudionik
2019. završen tečaj Znanost o laboratorijskim životinjama
2019. završen tečaj Vještine medicinske edukacije i znanstvenog rada
2020. suradnik na projektu „Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije

bubrega i urotrakta (CAKUT) tijekom razvoja u miša i čovjeka“,  
voditeljica projekta: prof. dr. sc. Katarina Vukojević

## ČLANSTVA

2018. Hrvatska liječnička komora  
2019. Hrvatsko društvo morfologa  
2019. Udruga Znanost, Split

## PUBLIKACIJE

**Kosović, Ivona;** Filipović, Natalija; Benzon, Benjamin; Bočina, Ivana; Glavina Durdov, Merica; Vukojević, Katarina; Saraga, Marijan; Saraga-Babić, Mirna. Connexin Signalling in the Juxtaglomerular Apparatus (JGA) of Developing, Postnatal Healthy and Nephrotic Human Kidneys. // *International journal of molecular sciences*, 21 (2020), 8349, 17  
doi:10.3390/ijms21218349 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

**Kosović, Ivona;** Filipović, Natalija; Benzon, Benjamin; Vukojević, Katarina; Saraga, Marijan; Glavina Durdov, Merica; Bočina, Ivana; Saraga-Babić, Mirna. Spatio-temporal patterning of different connexins in developing and postnatal human kidneys and in nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF). // *Scientific reports*, 10 (2020), 8756, 12  
doi:10.1038/s41598-020-65777-5 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Konjevoda, Suzana; Canovic, Samir; Pastar, Zrinjka; Tabain, Irena; Savic, Vladimir; Barbic, Ljubo; Dzelalija, Boris; Vukojevic, Katarina; Stevanovic, Vladimir; Mardesic, Snjezana;  
**Kosovic Ivona** et al. Ophthalmic manifestations of novel coronaviruses: precautionary measures and diagnostic possibilities. // *Journal of global health*, 10 (2020), 1; 010340, 4  
doi:10.7189/jogh.10.010340 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)

Borić Škaro, Dijana; Filipović, Natalija; Mizdrak, Maja; Glavina Durdov, Merica; Šolić, Ivana; **Kosović, Ivona;** Lozić, Mirela; Racetin, Anita; Jurić, Marija; Ljutić, Dragan; Vukojević, Katarina. SATB1 and PTEN expression patterns in biopsy proven kidney diseases. // *Acta histochemica*, 122 (2020), 8; 151631, 6 doi:10.1016/j.acthis.2020.151631 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)



Boric, Katarina; Mardesic, Snjezana; Martinovic Kaliterna, Dusanka; Radic, Mislav; Tadin Hadjina, Ivana; Vukojevic, Katarina; **Kosovic, Ivona**; Solic, Ivana; Zekic Tomas, Sandra; Saraga-Babic, Mirna. Expression of apoptotic and proliferation factors in gastric mucosa of patients with systemic sclerosis correlates with form of the disease. // Scientific reports, 9 (2019), 1; 18461, 10 doi:10.1038/s41598-019-54988-0 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Racetin, Anita; Jurić, Marija; Filipović, Natalija; Šolić, Ivana; **Kosović, Ivona**; Glavina Durdov, Merica; Kunac, Nenad; Zekić Tomaš, Sandra; Saraga, Marijan; Šoljić Violeta et al. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. // Croatian medical journal, 60 (2019), 6; 521-531 doi:10.3325/cmj.2019.60.521 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Arapović, Adela; Vukojević, Katarina; Glavina Durov, Merica; Benzon, Benjamin; Šolić, Ivana; Racetin, Anita; Jurić, Marija; Čujić, Tanja; **Kosović, Ivona**; Lozić, Mirela et al. Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. // Acta histochemica, 123 (2021), 151740, 7 doi:10.1016/j.acthis.2021.151740 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Lozić, Mirela; Filipović, Natalija; Jurić, Marija; **Kosović, Ivona**; Benzon, Benjamin; Šolić, Ivana; Kelam, Nela; Racetin, Anita; Watanabe, Koichiro; Katsuyama, Yu et al. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and Renin Expression Patterns in Postnatal Kidneys of Dab1<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. // International journal of molecular sciences, 22 (2021), 3; 1284, 18 doi:10.3390/ijms22031284 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Lasić, Valentina; **Kosović, Ivona**; Jurić, Marija; Racetin, Anita; Čurčić, Jelena; Šolić, Ivana; Lozić, Mirela; Filipović, Natalija; Šoljić, Violeta; Martinović, Vlatka et al. GREB1L, CRELD2 and ITGA10 expression in the human developmental and postnatal kidneys: an immunohistochemical study. // Acta histochemica (2021) (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Punda, Hrvoje; Mardešić, Snježana; Filipović, Natalija; **Kosović, Ivona**; Benzon, Benjamin; Ogorevc, Marin; Bočina, Ivana; Kolić, Krešimir; Vukojević, Katarina; Saraga-Babić, Mirna Expression Pattern of 5-HT (Serotonin) Receptors during Normal Development of the

Human Spinal Cord and Ganglia and in Fetus with Cervical Spina Bifida. // International journal of molecular sciences, 22 (2021), 7320, 20 doi:10.3390/ijms22147320 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

### SAŽECI SA SKUPOVA

**Kosović, Ivona;** Filipović, Natalija; Vukojevic, Katarina; Saraga, Marijan; Glavina Durdov, Merica; Bočina, Ivana; Saraga-Babić, Mirna

JGA OF DEVELOPING, HEALTHY AND NEPHROTIC HUMAN KIDNEYS CO - EXPRESS RENIN AND CONNEXINS. // Pediatric Nephrology

Venecija, Italija, 2019. str. 1827-1828 doi:10.1007/s00467-019-04325-4 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Racetin, Anita; Jurić, Marija; Lozić, Mirela; **Kosović, Ivona;** Šolić, Ivana; Filipović, Natalija; Saraga-Babić, Mirna; Vukojević, Katarina

NORMAL HUMAN KIDNEY DEVELOPMENT: EXPRESSION AND LOCALISATION OF DAB1 AND REELIN. // Pediatric Nephrology

Venecija, Italija, 2019. str. 1842-1843 doi:10.1007/s00467-019-04325-4 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Arapović, Adela; Šolić, Ivana; Racetin, Anita; Jurić, Marija; Čujić, Tanja; **Kosović, Ivona;** Borić, Dijana; Ljutić, Dragan; Saraga-Babić, Mirna; Vukojević, Katarina et al.

Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. // Pediatric Nephrology

Venecija, Italija, 2019. str. 1988-1988 doi:10.1007/s00467-019-04325-4 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Šolić, Ivana; Racetin, Anita; **Kosović, Ivona;** Jurić, Marija; Filipović, Natalija; Saraga, Marijan; Saraga-Babić, Mirna; Arapović, Adela; Vukojević, Katarina

Expression of Inversin and Dvl-1 in developing kidneys. // Pediatric Nephrology

Venecija, Italija, 2019. str. 1851-1852 doi:10.1007/s00467-019-04325-4 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

**Kosović, Ivona;** Šolić, Ivana; Jurić, Marija; Racetin, Anita; Lozić, Mirela; Lasić Arapović, Lidija; Filipović, Natalija; Lozić, Bernarda; Vukojević, Katarina; Saraga-Babić, Mirna

CX37, CX40, CX43 AND CX45 GENE EXPRESSION IN DEVELOPING, POSTNATAL AND NEPHROTIC HUMAN KIDNEYS. // 1 st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation

Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019. str. 85-85 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Šolić, Ivana; **Kosović, Ivona**; Jurić Marija; Racetin, Anita, Lozić, Mirela; Lasić Arapović, Lidija; Filipović Natalija; Saraga-Babić, Mirna; Vukojević, Katarina

GENE EXPRESSION OF  $\alpha$ -TUBULIN, INVERSIN AND DISHVELLED-1 IN POSTNATAL KIDNEY TISSUE. // 1 st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation

Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019. str. 76-76 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Racetin, Anita; Lozić, Mirela; Jurić, Marija; Šolić, Ivana; **Kosović, Ivona**; Kolobarić, Anita; Barbarić, Maja; Cloarec, Melissa; Filipović, Natalija; Saraga-Babić, Mirna; Vukojević, Katarina

CRKL GENE EXPRESSION IN KIDNEYS OF YOTARI MICE. // 1 st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation

Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019. str. 83-83 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Jurić, Marija; Racetin, Anita; Lozić, Mirela; Šolić, Ivana; **Kosović, Ivona**; Filipović, Natalija; Saraga-Babić, Mirna; Vukojević, Katarina

AIFM3 GENE EXPRESSION IN KIDNEYS OF YOTARI MICE. // 1 st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation

Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2019. str. 84-84 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)