

ULOGA KOŠTANOG MORFOGENETSKOG PROTEINA 7 U OČUVANJU TKIVA BUBREGA PRI TOPLOJ I HLADNOJ ISHEMIJI

Lacković, Alojzije

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:822958>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Alojzije Lacković

ULOGA KOŠTANOG

MORFOGENETSKOG PROTEINA 7 U OČUVANJU TKIVA

BUBREGA PRI TOPLOJ I HLADNOJ ISHEMIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Alojzije Lacković

ULOGA KOŠTANOG

MORFOGENETSKOG PROTEINA 7 U OČUVANJU TKIVA

BUBREGA PRI TOPLOJ I HLADNOJ ISHEMIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Tanja Ćelić, dr. med.

Diplomski rad ocijenjen je dana 19. lipnja 2019. u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof.dr.sc. Josip Španjol

2. Izv.prof.dr.sc. Olga Cvijanović

3. Izv.prof.dr.sc. Hrvoje Jakovac

Rad sadrži 40 stranica, 6 slika, 1 tablicu te 30 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc.dr.sc.Tanji Ćelić, na znanstvenim i stručnim savjetima, sugestijama te nesebičnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji i svojim roditeljima, koji su me uvijek podržavali te bili uz mene kada je bilo najpotrebnije. Na kraju, htio bih se zahvaliti svim kolegicama i kolegama, koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hladna ishemija bubrega	3
1.2. Topla ishemija bubrega	4
1.3. Oksidativni stres i antioksidativni sustavi	5
1.4. Otopine za hladnu pohranu organa	7
1.5. Uloga koštanog morfogenetskog proteina 7 u bubregu	8
2. CILJEVI I HIPOTEZA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1 Pokusne životinje i etički aspekti istraživanja.....	15
3.1.2 Reagencije	16
3.2. METODE	16
3.2.1. Hladna ishemija bubrega.....	16
3.2.2. Topla ishemija bubrega.....	17
3.2.3. Biokemijske analize.....	17
3.2.3.1. Priprema uzoraka bubrega za biokemijske analize	17
3.2.3.2. Određivanje razine produkata lipidne peroksidacije	18
3.2.3.3. Određivanje stupnja oksidativnog oštećenja proteina	18
3.2.3.4. Određivanje razina aktivnosti antioksidativnih enzima	19
3.2.3.5. Određivanje razine aktivnosti Na/K ATP-aze	19

3.2.3.6. Određivanje koncentracije proteina.....	20
3.3. Statistička obrada podataka	20
4. REZULTATI	21
4.1. Razina proteinskih karbonila (PCC).....	21
4.2. Oksidativno oštećenje lipida (TBARS).....	23
4.3. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD).....	25
4.4. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px).....	27
5. DISKUSIJA	31
6. ZAKLJUČCI	33
7. SAŽETAK.....	34
8. SUMMARY	35
9. LITERATURA	36
10. ŽIVOTOPIS.....	40

POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

ATP – eng. *Adenosine triphosphate*; adenzin trifosfat

BMP-7 – eng. *bone morphogenic protein 7*; koštani morfogenetski protein 7

BMPR – eng. *bone morphogenic protein receptor*; receptor za koštani morfogenetski protein

DNA – eng. *deoxyribonucleic acid*; deoksiribonukleinska kiselina

FDA – eng. *food and drug administration*; agencija za hranu i lijekove

GSH-Px – eng. *glutathione peroxidase*; glutation peroksidaza

HTK – eng. *histidine-triptophan-ketoglutarate*; histidin-triptofan-ketoglutarat

IL-6 – eng. interleukin 6

IRI – eng. *ischemia-reperfusion injury*; ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

MAP kinaza – eng. *mitogen-activated protein kinase*; mitogenom aktivirana protein kinaza

NADH – eng. *nicotinamide adenine dinucleotide*; nikotinamid adenin dinukleotid

Na/H izmjenjivač – natrij/vodik izmjenjivač

Na/K ATP-aza – natrij/kalij adenzin trifosfataza

OP-1 – eng. *osteogenic protein 1*; osteogenetski protein 1

Rho GTP-aza – eng. *ras homologous guanosine triphosphate*; rasu homologna gvanozin trifosfataza

TGF- β – eng. *transforming growth factor beta*; transformirajući čimbenik rasta beta

TNF- α – eng. *tumor necrosis factor alpha*, tumor nekrotizirajući faktor alfa

UW – eng. *University of Wisconsin*

1. UVOD

Transplantacija bubrega predstavlja najbolju i najuspješniju metodu liječenja kroničnog zatajenja bubrega. Danas se, s obzirom na trend starenja populacije, javlja sve veći broj bubrežnih bolesnika, a samim time povećan je i broj transplantacija bubrega. Prilikom procesa transplantacije, bubreg se eksplantira iz tijela donora, ispire se hladnom otopinom za čuvanje tkiva te se potom pohrani u ohlađenu otopinu na +4°C (1). Hipotermija smanjuje metaboličke potrebe tkiva te na taj način sprječava propadanje stanica i čuva vitalnost, ali i funkciju bubrega (2,3). Unatoč tome, hladnoća ne može u potpunosti spriječiti oštećenja nastala zbog prekida cirkulacije u tkivu bubrega, pri čemu u slučaju prolongirane hladne ishemije, dolazi do nekroze tkiva i razvoja tubulointersticijske fibroze. Vrijeme koje organ provodi pothlađen, između prestanka krvne opskrbe u tijelu donora (ekstrakcije) do priključenja bubrega u cirkulaciju primaoca, naziva se hladnom ishemijom (4). Zbog činjenice da proces transplantacije nije uvijek moguće učiniti u kratkom vremenskom roku, od iznimnog je značenja u tome periodu što uspješnije očuvati tkivo bubrega, pri čemu ključnu ulogu imaju prezervacijske otopine. Topla ishemija slijedi nakon hladne ishemije, vađenjem organa iz ohlađene otopine te traje do trenutka implantacije organa u tijelo primatelja, odnosno završava uspostavom cirkulacije kroz transplantirani organ. Nakon ishemije, hladne i tople, implantacijom bubrega u tijelo primaoca, započinje proces reperfuzije, koji izaziva novo oštećenje tkiva, a čitav proces naziva se ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom (engl. *ischemia – reperfusion injury*, IRI) (5). IRI je jedan od najvažnijih uzroka oslabljene funkcije transplantiranog bubrega te jedan od najčešćih uzroka njegovog odbacivanja (2,3). Dosada je identificirano nekoliko rizičnih čimbenika koji povećavaju vjerojatnost njezina nastanka, a jedan od najvažnijih je način prezervacije bubrega, odnosno duljina trajanja hladne i tople ishemije (6). Maksimalno vrijeme trajanja hladne ishemije bubrega iznosi 24 sata (1). Istraživanja su dokazala kako duljina trajanja hladne ishemije uvelike utječe na funkciju

transplantiranog bubrega. Produljeno vrijeme trajanja hladne ishemije uzrokuje oštećenje bubrega te povećava rizik nastanka odgođene funkcije presatka, koja se definira kao potreba za hemodijalizom unutar prvih 7 dana od transplantacije (6). Osnovni uzrok oštećenja tkiva u hladnoj ishemiji je nedostatak kisika, koji dovodi do smanjenja koncentracije adenosin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP), slabljenja aktivnosti Na/K-ATP-aze (Na/K crpke) te rezultira promjenama koncentracija iona i narušavanjem pH homeostaze (7). Kako bi se spriječio nastanak navedenih oštećenja, u kliničkoj se praksi za vrijeme trajanja hladne ishemije koriste različite otopine za ispiranje bubrega. Standardni kriterij u prezervaciji bubrega danas predstavlja University of Wisconsin (UW/Viaspan) otopina, koja ima veći antioksidativni potencijal u odnosu na preostale prezervacijske otopine (1). Postoji još nekoliko različitih otopina koje se koriste u prezervaciji bubrega, od kojih su najznačajnije histidin triptofan ketoglutarat (HTK/Custodiol) otopina te Euro-Collins otopina (8). Prema dosad provedenim istraživanjima, obje otopine imaju nešto lošiji zaštitni učinak u odnosu na Viaspan otopinu, s iznimkom prezervacije bubrega živih donora, gdje je HTK otopina pokazala najbolje rezultate, odnosno najmanju incidenciju nastanka odgođene funkcije presatka (9). Bubrež, za razliku od ostalih organa, ima sposobnost kompletne regeneracije oštećenja tkiva nastalog kao posljedica ishemijsko - reperfuzijske ozljede. Glavnu ulogu u procesu regeneracije ima aktivacija proteina koji su sastavni dio procesa nefrogeneze, kao i proliferacija epitela tubularnih stanica (9). Koštani morfogenetski protein 7 (engl. *bone morphogenetic protein 7*, BMP-7), najvažniji je protein iz te skupine. Riječ je o proteinu, koji pripada porodici proteina preobražujući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor* β , TGF- β), a u ljudskom organizmu se izražava i ostvaruje svoj učinak u bubregu, koštanom, hrskavičnom i masnom tkivu, timusu, koštanoj srži, slezeni, mozgu, srcu, skeletnoj muskulaturi, plućima, jetri, gušterači i prostati. U bubrezima se počinje stvarati u embrionalnom radoblju, ponajviše u glomerulu, epitelnim stanicama distalnih tubula i u

stanicama sabirnih kanalića te je jedini čimbenik koji je apsolutno neophodan za normalan razvoj bubrega. U slučaju nastanka akutne bubrežne ozljede, razina BMP-7 drastično se smanjuje, dok se prilikom oporavka bubrežne funkcije ubrzo vraća na normalnu razinu (10,11). Dosada provedena istraživanja pokazuju, da primjena BMP-7 u prezervacijskim otopinama ima pozitivan učinak na očuvanje funkcije bubrega, poticanju regeneracije oštećenja nastalih kao posljedica ishemijsko reperfuzijske ozljede te istovremeno smanjuje upalni odgovor i apoptozu stanica (12).

1.1. Hladna ishemija bubrega

Vrijeme trajanja hladne ishemije ima ključnu ulogu u uspjehu transplantacije bubrega. Prolongirana hladna ishemija predstavlja rizični čimbenik za nastanak odgođene funkcije presatka, akutnog bubrežnog odbacivanje te gubitka funkcije presatka. Upravo iz tih razloga, cilj svakog postupka transplantacije je pokušati skratiti vrijeme trajanja hladne ishemije, kako bi se sačuvala funkcija bubrega (13). Ishemijska ozljeda nastaje kao posljedica smanjene opskrbe tkiva kisikom, a može se javiti u različitim stanjima, poput akutnog koronarnog sindroma, ishemije crijeva, akutne bubrežne ozljede, moždanog udara te transplantacije organa. Jedinstvena karakteristika bubrega, u usporedbi s većinom drugih organa, jest da se može u potpunosti oporaviti od tranzitorne ishemije, što ga čini idealnim organom za proučavanje mehanizama regeneracije tkiva nakon ishemijskih oštećenja (14). Osnovni razlog oštećenja stanica u hladnoj ishemiji jest nedostatak kisika, pri čemu najprije stradava proces aerobne razgradnje glukoze. Ubrzo nakon prestanka opskrbe tkiva kisikom u stanicama prestaje proces oksidativne fosforilacije te od tog trenutka anaerobna glikoliza predstavlja jedini izvor energije za stanicu. Obzirom da anaerobnom razgradnjom jedne molekule glukoze nastaju samo dvije molekule ATP-a, za razliku od aerobne razgradnje u kojoj nastaje 36 molekula ATP-a, koncentracija ATP-a u stanici počinje se brzo smanjivati. Istovremeno

dolazi i do nakupljanja metabolita, poput laktata i NADH, koji narušavaju pH homeostazu tkiva, kao i proces glikolize, tako da već nakon nekoliko minuta dolazi do manjka ATP-a. Kompenzacijski odgovor stanice na acidozu jest aktivacija Na/H izmjenjivača, prilikom čega veća količina natrija izlazi iz stanice u zamjenu za vodikove ione. Ishemijski uvjeti i nedostatak ATP-a najprije pogađaju stanične sustave kojima je potrebna najveća količina energije, a to su transportni sustavi odgovorni za održavanje ionske homeostaze, poput Na/K ATP-aze te kalcijske crpke. Prestanak njihova rada rezultira povećanjem izvanstanične koncentracije kalija, uz istodobno nakupljanje natrija, kalcija i vode u stanici. Manjak energije također dovodi do deagregacije poliribosoma te inhibicije sinteze bjelančevina (16). Ukoliko hipoksija potraje određeni vremenski period, stanica u jednom trenutku prelazi točku nakon koje oštećenja postaju u potpunosti ireverzibilna. Najbolji pokazatelj ireverzibilnog oštećenja stanice jest stanje mitohondrija. U takvim uvjetima dolazi do bubrenja mitohondrija, s posljedičnim povećanjem propusnosti mitohondrijske membrane, koje ima negativan utjecaj na različite funkcije stanice (16). Najvažniji uzrok ireverzibilnih promjena stanice jest izrazito povećanje citosolske koncentracije kalcija, koji osim što potiče mitohondrijsku permeabilitetnu tranziciju, istovremeno sam ili u kombinaciji s kalmodulinom pokreće različite mehanizme kojima dodatno oštećuje stanicu. Ishemijska ozljeda također može potaknuti i proupalni odgovor, koji rezultira pojačanom aktivacijom upalnih stanica i upalnih čimbenika, rezultirajući daljnjim oštećenjem tkiva (17). Proupalni citokini, poput interleukina 6 te TNF- α imaju glavnu ulogu u ovom procesu (18).

1.2. Topla ishemija bubrega

Vrijeme tople ishemije, pojam je koji definira vremenski period ishemije stanica i tkiva organa, koji se zbiva u uvjetima normalne tjelesne temperature. Kada je riječ o transplantaciji, vrijeme tople ishemije podrazumijeva dva različita perioda procesa transplantacije. Prvi period

tope ishemije organa započinje zaustavljanjem protoka krvi u tijelu donora kroz ciljni organ i traje sve do pohrane tog istog organa u ohlađenu otopinu. Drugi period tope ishemije, započinje vađenjem organa iz ohlađene otopine te traje do trenutka implantacije organa u tijelo primatelja, odnosno završava uspostavom cirkulacije kroz transplantirani organ (19). Topla ishemija bi u idealnim uvjetima trebala trajati do 30 minuta, dok se svaka topla ishemija u vremenu trajanja dužem od 30 minuta, definira kao prolongirana topla ishemija. Istraživanja su dokazala kako prolongirana topla ishemija, kao i hladna ishemija, ima nepovoljan utjecaj na funkciju presatka bubrega te može rezultirati odgođenom bubrežnom funkcijom, odbacivanjem presatka, kao i produženim vremenom trajanja hospitalizacije primatelja (20). Zasada je identificirano nekoliko različitih čimbenika, koji povećavaju rizik nastanka tope ishemije bubrega poput: muškog spola donora, starije životne dobi donora, transplantacije desnog bubrega, povišene tjelesne mase primaoca, prethodne transplantacije bubrega te produljenog vremena trajanja hladne ishemije.

1.3. Oksidativni stres i antioksidativni sustavi

Teži oblik oštećenja tkiva nastaje ponovnom uspostavom cirkulacije, odnosno reperfuzijom, pri čemu dolazi do pojačanog ulaska kisika u stanice te stvaranja velike količine slobodnih kisikovih radikala, koji uzrokuju oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Krajnji rezultat ovakvih događanja jest da stanica gubi svoj vlastiti integritet i odumire (5). Slobodni radikali su molekule ili dijelovi molekula koji sadrže nesporeni elektron u vanjskoj ljusci. Upravo nesporeni elektron omogućuje slobodnim radikalima veliku reaktivnost te smanjenu specifičnost za reaktante. Iz tog razloga mogu reagirati s različitim spojevima te imaju kratak poluvijek trajanja. Vezanjem na ciljne molekule, slobodni radikali pokreću neenzimske lančane reakcije. Slobodni radikali mogu nastati u tkivu na različite načine, kao što su nepotpuna redukcija kisika, enzimskim reakcijama, radiolizom malih molekula, kao

međuproizvod metabolizma egzogenih i endogenih molekula u tkivima te pri aktivaciji trombocita (5). Najvažniji slobodni kisikovi radikali jesu superoksidni anion (O_2^{2-}), vodikov peroksid (H_2O_2) te hidroksilni radikal (OH^\cdot). Dnevno, procesom nepotpune redukcije kisika u tkivu, nastane $2-4 \times 10^{10}$ slobodnih kisikovih radikala. U hipoksiji, povišena koncentracija kalcija unutar stanice potiče stvaranje slobodnih kisikovih radikala, pomoću različitih procesa, poput poticanja metabolizma arahidonske kiseline, permeabilne tranzicije mitohondrija te pretvorbe ksantin-dehidrogenaze u ksantin-oksidazu. Prilikom ponovnog uspostavljanja cirkulacije, ksantin oksidaza prevodi dostupne velike količine kisika u kisikove radikale, čime nastaje preveliko opterećenje tkiva radikalima, što predstavlja osnovu postishemijskog oštećenja tkiva (5). Ljudski organizam djelomično je zaštićen od djelovanja slobodnih kisikovih radikala, pomoću vlastitih antioksidativnih enzimatskih sustava, poput superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GSH-Px) te katalaze, ali i pomoću prirodnih antioksidansa, kao što su vitamini C i E, koenzim Q, ubikvinon, metionin, cistein i melatonin (21). Enzimskim reakcijama se slobodni radikali prevode u manje toksične ili pak netoksične spojeve. Dva različita oblika SOD pretvaraju superoksidni anion u manje toksičan spoj, vodikov peroksid (H_2O_2), koji se kasnije pomoću katalaze razlaže do vode i kisika. Oštećenja u tkivima mogu nastati kao posljedica slabosti zaštitnih mehanizama ili zbog prevelike proizvodnje slobodnih radikala. Kada je riječ o proteinima, ciljno mjesto djelovanja slobodnih radikala predstavljaju aminokiseline. Izravna oksidacija bočnih lanaca aminokiselina dovodi do karbonilacije proteina i stvaranja karbonilnih skupina (aldehidi i ketoni), pri čemu je ubrzan katabolizam proteina te je posljedično i skraćen poluvijek molekula u stanici (21). Arginin, lizin, prolin i treonin su aminokiseline koje su posebno osjetljive na djelovanje slobodnih kisikovih radikala. Oduzimanje vodikovih iona iz tiolne skupine cisteina, može dovesti do stvaranja disulfidnih veza i nepravilnog preklapanja proteina. Nenormalno preklapanje može uzrokovati gubitak funkcije, ali i agregaciju proteina

te smrt stanice (21). Slobodni radikali sudjeluju u patogenezi ateroskleroze oksidacijom LDL-čestica koje time dobivaju jaka aterogena svojstva. Hidroksilni radikali mogu izazvati lipidnu peroksidaciju u staničnoj membrani, prilikom čega dolazi do povećane propusnosti stanice i njene smrti. Kada je riječ o bubregu, ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje tkiva dovodi do procesa tubulointersticijske fibroze, koji nastaje kao posljedica pojačanog stvaranja TGF- β te drugih profibrotičkih čimbenika, koji zajedno stimuliraju proliferaciju fibroblasta, sintezu ekstracelularnog matriksa te pretvorbu epitelnog tkiva u mezenhimalno tkivo. Proces fibroze bubrega je ireverzibilan te rezultira smanjenjem bubrežne funkcije. TGF- β aktivacijom i poticanjem fibroblasta na povećano stvaranje komponenti izvanstaničnog matriksa, poput kolagena tipa IV te fibronektina, predstavlja glavni čimbenik uključen u proces fibroze bubrega (1).

1.4. Otopine za hladnu pohranu organa

Danas se, u svrhu očuvanja tkiva bubrega koriste različite otopine, koje se razlikuju prema svojem kemijskom sastavu. Najznačajnije otopine, koje se koriste za čuvanje bubrega su: HTK otopina, Euro-Collins otopina te UW otopina, koja ujedino predstavlja i zlatni standard u očuvanju bubrega (1). Euro-Collins otopina, proizvedena je prvi puta krajem 60-ih godina 20. stoljeća, kao prva otopina sa svrhom očuvanja bubrega tijekom procesa transplantacije. Riječ je o otopini, čije su glavne sastavnice fosfati i glukoza (8). Glavna uloga fosfata je da djeluju kao pH puferi, dok glukoza ulazi u stanice te predstavlja izvor energije za stanicu i njen anaerobni metabolizam. HTK otopina, inicijalno se koristila tijekom kardioplegije, za vrijeme kirurških zahvata na srcu, a tek se kasnije počela koristiti i kao prezervacijska otopina tijekom transplantacije organa (8). Osnovne sastavnice HTK otopine su histidin, koji djeluje kao pufer te dvije aminokiseline: triptofan i ketoglutarat. Triptofan ima antioksidativni učinak, a ujedino djeluje i kao stabilizator stanične membrane, dok ketoglutarat predstavlja supstrat za

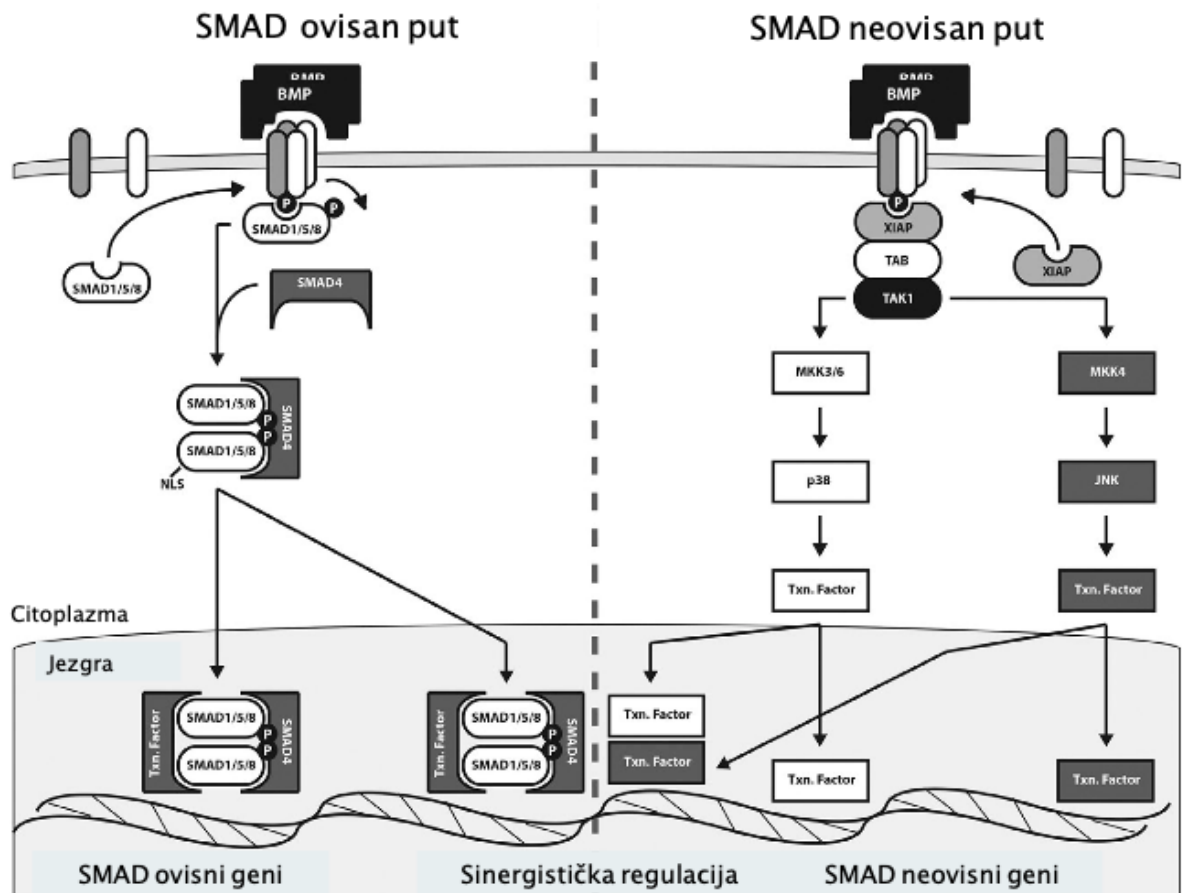
processe anaerobnog metabolizma stanice tijekom procesa prezervacije. UW otopina prvi je puta proizvedena 80-ih godina 20. stoljeća te od tada predstavlja zlatni standard u očuvanju bubrega, ali i jetre, gušterače te tankog crijeva (1). Najvažnije sastavnice UW otopine su alopurinol, adenzin i glutation čija je uloga opskrbiti stanice ATP-om, inhibirati aktivnost ksantin oksidaze te pružiti zaštitu bubrega od reperfuzijske ozljede.

1.5. Uloga koštanog morfogenetskog proteina 7 u bubregu

BMP-7 je protein koji pripada obitelji proteina TGF- β , a još je poznat i pod nazivom koštani osteogeni protein-1 (OP-1). Jedan je od 15 do sada poznatih oblika BMP-a. Prvotno je otkriven kao čimbenik koji sudjeluju u nadzoru izgradnje koštanog tkiva te omogućuje sintezu koštanog tkiva na ektopičnim mjestima, zahvaljujući čemu je i dobio naziv koštani morfogenetski protein. BMP-7 se sintetizira pretežno u bubregu u gestacijskoj dobi od 5-14 tjedana te je prepoznat kao ključna signalna molekula tijekom razvoja bubrega (23). Njegovu važnost u embrionalnom razvoju najbolje dokazuje činjenica da je tijekom evolucije ostao skoro potpuno jednak, odnosno ljudski BMP-7 pokazuje 98% homologije s aminokiselinskim slijedom BMP-7 u miša (12). Osim uloge u embriogenezi, BMP-7 ima važnu ulogu postnatalno tijekom razdoblja cijeljenja i regeneracije tkiva i organa koji se stvaraju putem mezenhimno-epitelnog međudjelovanja, od kojih je najvažniji bubreg. BMP-7 sudjeluje u procesima migracije, proliferacije te diferencijacije stanica mezenhimalnog podrijetla. Dosadašnja istraživanja na animalnim modelima, dokazala su njegov protektivni učinak na bubrege tijekom akutne i kronične bubrežne ozljede, a koji je posljedica sprječavanja pretvorbe epitelnih stanica bubrežnih kanalića u mezenhimalne stanice te njihove apoptoze. BMP-7 se unutar stanice sintetizira u obliku velike prekursorske molekule, koja je nekoliko puta veća od aktivnog oblika proteina (12). Sastoji se od tri različite regije, aminoterminalnog kraja veličine 29 aminokiselina, zrele regije veličine 293-431 aminokiselina te

karboksiterminalne domene veličine 29-292 aminokiselina. Prekursorska se molekula prije sekrecije proteolitički cijepa, prilikom čega se karboksiterminalna domena odvoji te time nastane aktivni oblik BMP-7. Aktivna molekula BMP-7 se pojavljuje u obliku homodimera intracelularno, u ekstracelularnom matriksu te u manjim količinama u krvi. BMP-7 svoj učinak ostvaruje vezanjem za dva srodna oblika serin/treonin kinaznih receptora, tip 1 (BMPR IA i BMPR IB) te tip 2 (BMPR II) (12). Kako bi se signal adekvatno prenosio, potrebna je aktivacija obje grupe receptora. Obje skupine receptora nalaze se na staničnoj membrani, u obliku monomera (jedan tip I ili II receptor), homodimera (dva receptora tipa I ili II) ili kao preformirani receptorski kompleks (dva receptora tipa I + dva receptora tipa II), a zastupljenost receptora se razlikuje ovisno o tipu tkiva (24). Istraživanja su pokazala kako je ekspresija BMPR-II kontinuirano prisutna u epitelu proksimalnih kanalića bubrega, dok je ekspresija BMPR-I promjenjiva te ovisna o različitim poremećajima bubrežne funkcije. U trenutku kada se BMP-7 veže na receptorski kompleks, dolazi do prijenosa signala unutar stanice aktivacijom Smad ovisnog ili putem Smad neovisnog signalnog puta (24). Kada postoji preformirani receptorski kompleks signal se prenosi Smad signalnim putem, dok vezanjem za visokoafinitetni monomerni receptor tipa I nastaje njegova homodimerizacija kojoj se kasnije priključuje i receptor tipa II, čime dolazi do aktivacije Smad neovisnog p38 signalnog puta. Prijenos signala dominantno se odvija putem Smad signalnog puta. Signalni put čine Smad molekule koje su smještene u citoplazmi stanice te su podijeljene u tri osnovne podskupine: receptorom regulirani Smad (R-Smad: Smad1, Smad5, Smad8), kostimulator Smad (Co-Smad: Smad4) i inhibitorni Smad (I-Smad: Smad6, Smad7) (24). Smad 1, 5 i 8 su dio signalnog puta BMP-7. Vezanjem za preformirani receptorski kompleks, tip II receptor fosforilira receptor tipa I i time dovodi do njegove aktivacije. R-SMAD protein se nakon toga fosforilira te veže na sebe Co-SMAD protein. Novonastali heterodimer nakon toga se translocira u jezgru, gdje se najčešće veže za CAGATCTG sekvencu, koja se još naziva i

SMAD Response Element ilii SRE, ali se također može vezati i za GCCGnCGC sekvence (24). Vezanjem za DNA sekvence započinje interakcija Smad proteina, s ciljnim transkripcijskim faktorima poput: Runx1-3, Hoxc8, MyoD, Msx1, OAZ te YY1, dok su ciljni geni Id1-Id4, Oterix, Msx1, Msx2, Smad6, Smad7, Prx2, TIEG, Hey1 i Tcf7. Regulacijom transkripcije određenih gena BMP-7 utječe na procese proliferacije, diferencijacije, morfogeneze i apoptoze stanice. BMP-7 može regulirati transkripciju gena neovisno o Smad signalnom putu (12). Smad neovisni signalni put reguliran je djelovanjem MAP kinaza (p38, JNK te EPK) te Rho GTP-aza (RhoA, Rac, Cdc42) (slika 1)(24).



Slika 1. BMP-7 signalni put. SMAD-ovisan put signalizacije započinje vezanjem BMP-7 dimera na preformirani receptorski kompleks koji se sastoji od dva BMP receptora tipa 1 te dva receptora tipa 2. Nakon toga, tip 2 receptora fosforilira tip 1 receptor kako bi stvorio vezno mjesto za R-SMAD protein. R-SMAD protein se fosforilira i odvaja od receptorskog kompleksa te veže na sebe C-SMAD protein. Novonastali heterodimerski kompleks putuje prema jezgri te ulazi u interakciju s transkripcijskim faktorima i sudjeluje u regulaciji transkripcije gena. Aktivacija SMAD-neovisnog puta posredovana je vezanjem XIAP-a za aktivirani receptor, koji ujedino omogućuje i komunikaciju između TAB-a i TAK 1 kinaze. Nakon toga, TAK 1 kinaza aktivira p38 signalni put pomoću MKK3/6 te JNK signalni put putem MKK 4. Aktivacija ovih signalnih molekula omogućuje BMP-7 proteinu aktivaciju SMAD-ovisnog, SMAD-neovisnog, ali i zajedničkog puta signalizacije. (Preuzeto i modificirano od Manson SR, Austin PF, Guo Q, Moore KH. *BMP-7 Signaling and its Critical Roles in Kidney Development, the Responses to Renal Injury, and Chronic Kidney Disease*. *Vitam Horm* 2015;99:91-144.)

Važna uloga BMP-7 u razvoju bubrega prvi put je uočena prije 20 godina, kada su istraživanja na miševima dokazala kako su bubrezi BMP-7 *knock out* miševa displastični te su sadržavali znatno manji broj glomerula (3 glomerula u odnosu na 100 glomerula u normalnoj populaciji), a životinje su umirale unutar 24-48 sati nakon rođenja (25). Nedostatak BMP-7

dovodi do poremećaja grananja sabirnih kanalića bubrega, diferencijacije epitelnih stanica bubrega te kondenzacije metanefričkog mezenhima. Isto tako embriji kod kojih nije bio izražen BMP-7 gen, pokazivali su različite abnormalnosti skeleta, poput unilateralne polidaktilije te abnormalnosti oka, poput mikroftalmije te anoftalmije (25,26). Tijekom normalnog razvoja bubrega u miša, ekspresija BMP-7 započinje već 11. dan embrionalnog razvoja u ureteru i sabirnim cijevima bubrega te traje za vrijeme čitavog embrionalnog razvoja. Ekspresija je prisutna također i u induciranom mezenhimu iz kojeg će se razviti glomeruli te proksimalni i distalni kanalići bubrega. Stanice epitela kanalića bubrega izlučuju BMP-7 na autokrini način (25). Važnu ulogu u razvoju bubrega također imaju i BMP-2, -3, -4, -5 i -6, međutim jedino je nedostatak BMP-7 letalan. Kada je riječ o odrasloj jedinki, ekspresija BMP-7 je prisutna u čitavom nefronu. Istraživanja su pokazala kako se razina ekspresije BMP-7 ubrzano smanjuje u slučaju nastanka akutne bubrežne ozljede, dok se oporavkom bubrežne funkcije njegova razina ubrzo vraća na normalnu razinu. Iako proučavanja različitih fizioloških uloga BMP-7 i dalje ostaju predmet istraživanja, sve je očitija njegova povezanost s kroničnom bubrežnom bolesti. Eksperimentalni modeli su dokazali kako se gubitak ekspresije BMP-7 i njegove protektivne uloge, javljaju u različitim oboljenjima bubrega, poput ishemijske ozljede bubrega, opstruktivnoj uropatiji, dijabetičkoj nefropatiji i u toksičnim oštećenjima bubrega. Glavni mehanizam, kojim postiže takav učinak jest inhibicija tubulointersticijske fibroze u bubregu, na koju prvenstveno utječe TGF- β 1 (25). Vezanjem za različitu vrstu receptora i aktivacijom različitih Smad signalnih puteva, BMP-7 sprječava učinak TGF- β 1 te inhibira pretvorbu epitelnih stanica u mezenhimalne, odnosno inhibira proces fibroze (25). Primjena BMP-7, u životinjskih modela s induciranim dijabetesom, odgodila je početak dijabetičke nefropatije i glomeruloskleroze te ujedino poboljšala glomerularnu filtraciju u uznapredovalim oblicima bolesti. Također, u životinjskih modela s lupusnim nefritisom, primjena BMP-7 usporila je i smanjila razinu tubularne

atrofije, serumskog kreatinina te poboljšala ishod bolesti (26). Slična istraživanja nedavno su proširena i na ljudske modele. Istraživanja su pokazala kako smanjenje koncentracije cirkulirajućeg BMP-7 predstavlja prediktivni čimbenik za razvoj završnog stadija kronične bubrežne bolesti u pacijenata sa šećernom bolesti. Isto tako, dokazano je kako se praćenjem pada razine BMP-7 može predvidjeti gubitak bubrežne funkcije u pacijenata sa proteinurijom (26). Određene studije proučavale su moguću terapijsku primjenu BMP-7 u kroničnoj bubrežnoj bolesti, koje su dokazale kako njegova primjena, ne samo da inhibira nastanak bubrežnog oštećenja, već sudjeluje i u popravku postojećih oštećenja. Obzirom na rezultate navedenih istraživanja te da je Agencija za hranu i lijekove (engl. *food and drug administration*, FDA) već ranije odobrila protokol za primjenu BMP-7 u regeneraciji fraktura kostiju, postoji velika mogućnost njegove skorije kliničke primjene u liječenju bubrežnog oštećenja, iako su daljnja istraživanja na ljudskoj populaciji nužna (26).

2. CILJEVI I HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da će primjena rekombinantnog humanog BMP-7 proteina u modelu hladne i tople ishemije bubrega poboljšati tkivnu homeostazu bubrega, smanjiti količinu oštećenja bubrega nastalih za vrijeme trajanja hladne i tople ishemije te istovremeno rezultirati većim antioksidativnim kapacitetom bubrežnog tkiva. Obzirom na hipotezu postavljeni su slijedeći ciljevi:

- 1) Istražiti hoće li dodavanje BMP-7 u UW otopinu dovesti do manjeg oštećenja lipida i proteina, Na/K ATP-aze, te veće učinkovitosti antioksidativnih sustava, u odnosu na samu UW otopinu
- 2) Usporediti rezultate djelovanja BMP-7 u odnosu na UW otopinu tijekom procesa hladne i tople ishemije bubrega.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1 Pokusne životinje i etički aspekti istraživanja

Svi pokusi su učinjeni na odraslim Wistar štakorima muškog spola, tjelesne mase 350-400g. Postupanje sa životinjama odvijalo se u skladu sa zakonskim odredbama Republike Hrvatske (Zakon o dobrobiti životinja, NN19/99; Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, NN 176/2004) te europskim smjernicama sukladno direktivama Vijeća Europe (86/609/EEC). Istraživanja su provedena sukladno bioetičkim standardima o provođenju pokusa na životinjama, uz izbjegavanje nepotrebnih pokusa i patnje životinja te u skladu s osnovama tzv. 3R pristupa: *Replacement* = nadomještanje životinja, *Reduction* = smanjenje broja životinja, *Refinement* = oplemenjivanje postupaka prema životinjama. Planirano je istraživanje obuhvaćalo ukupno 45 životinja, koje su nasumično podijeljene u 4 skupine podvrgnute hladnoj i toploj ishemiji te 1 kontrolnu skupinu. Životinjama iz svake skupine izvađena su oba bubrega (N=90) i s obzirom na način njihova tretiranja, uzorci tkiva u istraživanju su podijeljeni u četiri skupine. U prvoj skupini, bubrezi su isprani (perfuzija) s fiziološkom otopinom, u drugoj skupini su isprani standardnom UW otopinom, u trećoj skupini su isprani s rekombinantnim humanim BMP-7 proteinom (engl. *recombinant human BMP-7 protein*, rhBMP-7) (rhBMP-7 je administriran u dozi od 0,02 µg/ml s fiziološkom otopinom kao otapalom), a u četvrtoj skupini su isprani s kombinacijom rhBMP-7+UW otopina (tablica 1). Volumen perfuzijske otopine iznosio je 5ml. Svaka pojedina skupina sastojala se od 10 životinja, dok se u kontrolnoj skupini nalazilo 5 životinja. Nadalje, svaka tretirana skupina od 10 životinja podijeljena je u dvije vremenske podskupine s obzirom na vrijeme trajanja hladne ishemije od 12 i 24 sata. Nakon čuvanja bubrega na +4 °C tijekom 12 ili 24 sata te tople ishemije u trajanju 30 minuta u trenutku kada su krvne žile spojene, ali cirkulacija još nije započela bubrezi se smrzavaju u tekućem dušiku

i uskladišteni su na -80°C . U kontrolnoj skupini izvađeni bubrezi su isprani s fiziološkom otopinom i nisu prošli postupak hladne ni tople ishemije već su odmah smrznuti u tekućem dušiku.

Tablica 1. Broj životinja korišten za toplu i hladnu ishemiju

	Eksperimentalna skupina	Broj bubrega izloženih hladnoj i toploj ishemiji		Broj životinja
		12 sati	24 sata	
1.	Bubrezi ispirani fiziološkom otopinom (F.O.)	10	10	10
2.	Bubrezi ispirani University of Winsconsin otopinom (UW)	10	10	10
3.	Bubrezi ispirani rhBMP-7 otopinom (rhBMP-7)	10	10	10
4.	Bubrezi ispirani kombinacijom rhBMP-7 i UW otopinom	10	10	10
<hr/>				
5.	Kontrolna skupina			5
			ukupno	45

3.1.2 Reagencije

U pokusima je korišten rekombinantni humani koštani morfogenetski protein-7 (rhBMP-7, koncentracija 0,1 mg/ml, MyBioSource, San Diego, California) te University of Wisconsin otopina (UW, Viaspan, DuPont Pharma, Wilmington, Delaware).

3.2. METODE

3.2.1. Hladna ishemija bubrega

Životinje su uvedene u opću anesteziju s ketaminhidrokloridom (0,1mg/g tjelesne težine, intraperitonealno, IP) i xylazinhydrochloridom (0,02mg/g tjelesne težine, IP). Tijekom kirurškog postupka, životinje su smještene na grijanoj podlozi za održavanje tjelesne

temperature na 36,5–37°C . Napravljen je rez po sredini meke trbušne stijenke, pri čemu su prikazani unutarnji organi, koji su izvađeni i umotani u gazu natopljenju fiziološkom otopinom, kako bi se prikazala oba bubrega te odsječci abdominalne aorte i donje šuplje vene, iznad i ispod izlazišta bubrežne arterije i vene. Kanulirana je aorta i donja šuplja vena, a njihovi distalni i proksimalni okrajci zatvoreni klemom. Oba bubrega su *in situ* isprana fiziološkom otopinom pod pritiskom 100mmH₂O tijekom 3 minute kako bi se isprala krv. Odstranjeno je bubrežno masno tkivo te su izvađena oba bubrega s pripadajućim krvnim žilama. Bubrež je dodatno ispran s 5ml određene otopine ovisno o pokusnoj skupini kojoj pripada. Zatim je bubrež pohranjen tijekom 12 ili 24 sata na +4°C u posudi ispunjenoj istom otopinom kojom je ispran.

3.2.2. Topla ishemija bubrega

Nakon čuvanja bubrega na +4 °C tijekom 12 ili 24 sata, bubrezi su transplantirani u tijelo primatelja. Nakon toga su krvne žile spojene, ali cirkulacija još nije započela prilikom čega je nastupio proces tople ishemije. Vrijeme trajanja tople ishemije iznosilo je maksimalno 30 minuta.

3.2.3. Biokemijske analize

3.2.3.1. Priprema uzoraka bubrega za biokemijske analize

Sve biokemijske analize učinjene su u cijelom bubregu. Uzorci tkiva smrznuti su na suhom ledu i pohranjeni na –80°C do vremena analize. Odmrznuti uzorci tkiva homogenizirani su na ledu pomoću ultrazvučnog homogenizatora (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD) u 20mM Tris-HCl puferu, pH7,4 (omjer mase tkiva i volumena pufera 1:10). Alikvoti od po 150µL homogenata su odvojeni za određivanje razina produkata lipidne peroksidacije i pohranjeni na –80°C do analize. Ostatak homogenata potom je centrifugiran 10 minuta u rashlađenoj (+4°C)

centrifugi (Centurion Scientific, West Sussex, UK) na 14000 g. Nadsloj je odvojen i ponovno zamrznut na -80°C , a kasnije upotrijebljen za određivanje aktivnosti SOD i GSH-Px te koncentracije proteina.

3.2.3.2. Određivanje razine produkata lipidne peroksidacije

Razine produkata lipidne peroksidacije u homogenatima tkiva određivane su spektrofotometrijskim mjerenjem reakcijskih proizvoda tiobarbiturine kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), pomoću metode koju su prvi opisali Ohkawa i sur (27). Homogenati tkiva ($150\mu\text{L}$) inkubirani su pomoću $75\mu\text{L}$ 8,1 % natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom im je dodano $925\mu\text{L}$ 20 % acetatnog pufera (pH3,5 s 5M NaOH). Uzorci su centrifugirani na $10000\times g$ 15 minuta. Alikvotima nadslojeva od po 1 mL dodan je isti volumen 0,8% tiobarbiturine kiseline, a potom su uzorci inkubirani u vodenoj kupelji 1 sat na 95°C . Nakon hlađenja uzoraka na ledu, dodana su 2mL mješavine n-butanola i piridina (15:1, v/v), a TBARS su ekstrahirani centrifugiranjem na $2200\times g$ 10 min. Apsorbancija organskog nadsloja očitana je na $\lambda = 532$ nm. Vrijednosti dobivene za slijepu probu (za koju je umjesto uzorka korišten pufer za pripremu uzoraka) oduzete su od svih dobivenih mjerenja za uzorke.

3.2.3.3. Određivanje stupnja oksidativnog oštećenja proteina

Stupanj oksidativnog oštećenja proteina određen je mjerenjem sadržaja karboniliranih proteina. U pripremljeni uzorak otopine proteina dodan je 10nM DNPH (2,4–dinitrophenylhydrazine)/2M HCl. Smjesa je inkubirana tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi, nakon čega su proteini precipitirani dodavanjem hladne 10% trikloroacetne kiseline (engl. *trichloroacetic acid*, TCA) i inkubirani 10 minuta na ledu. Centrifugiranjem na $14000\times g$ u trajanju od 10 minuta stvorio se supernatant koji je odbačen. Talog je zadržan i

ispran tri puta s po 1 ml etanol/etil acetata (1:1). Između svakog ispiranja uzorak je centrifugiran na 14000xg tijekom 15 minuta. Finalni talog je resuspendiran u 0.6 ml 6M urei/2 N HCl/PBS uz pH2.3 miješanjem na 37°C kroz 15 minuta dok se talog potpuno ne otopi. Sadržaj karboniliranih proteina određen je očitavanjem apsorbancije na $\lambda = 366$ nm. Za slijepu probu umjesto DNPH korištena je obična voda.

3.2.3.4. Određivanje razina aktivnosti antioksidativnih enzima

Aktivnost SOD određivana je korištenjem komercijalno dostupnog RANSOD kita, proizvođača Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK). U ovoj metodi koriste se ksantin i ksantin oksidaza (XO) kako bi se stvorili superoksidni radikali koji potom reagiraju s 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijevim kloridom (I.N.T.) te nastaje crvena formazinska boja. Enzim prisutan u uzorku natječe za se s I.N.T. za superoksidne radikale i time sprječava stvaranje boje. Aktivnost SOD mjeri se sukladno stupnju inhibicije ove reakcije, a prati se spektrofotometrijski na $\lambda = 505$ nm. Aktivnost GSH-Px određivana je metodom koju su opisali Paglia i Valentine (28). Analiza je učinjena pomoću komercijalnog RANSEL kita proizvođača Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK). Istraživani enzim katalizira redukciju kumena hidroperoksida uz istodobnu oksidaciju GSH. U prisustvu glutathion reduktaze (GR) i NADPH, oksidirani GSH se trenutno reciklira u reduciranu formu uz popratnu oksidaciju NADPH u NADP⁺. Ova se reakcija prati spektrofotometrijski, a očituje se kao smanjenje u apsorbanciji na $\lambda=340$ nm. Stupanj smanjenja apsorbancije direktno je proporcionalan s aktivnosti GSH-Px u uzorku.

3.2.3.5. Određivanje razine aktivnosti Na⁺/K⁺ ATP-aze

Određivanje razine aktivnosti Na⁺, K⁺ ATP-aze je obavljeno prema Lucu i Flik, 1999, u supernatantu. Aktivnost je procijenjena u triplicatima inkubirajući 30 μ l homogenata s 250 μ l otopine za inkubaciju A. Istovremeno su drugi triplicati homogenata tretirani s otopinom za

inkubaciju E. Obje otopine za inkubaciju sadrže u sebi osnovnu otopinu- Assay solution (AS) koja se sastoji od 40 ml otopine za inkubaciju uzorka (0,5 L otopine = 200 mM NaCl 5,844 g; 10 mM MgCl₂ 1,0165 g; 0,2 mM EDTA 0,02922 g; 60 mM imidazol 2,0424 g; pH 7,5 (određen pomoću HEPES) i 8 ml Na₂ATP (AS; 50 ml otopine =30 mM Na₂ATP 0,8267 g; Boeringer Lot 137 68431-04 (Adenozin-5-trifosfat); pH do 7,5 TRIS (pohraniti na -20 °C u zamrzivaču). Razlika između otopine je u tome što otopina A sadrži 24 ml AS, 8 ml KCl (100 ml; 125 mM KCL; 0,932 g) i 8 ml destilirane vode, dok otopina E sadrži 24 ml AS, 16 ml destilirane vode i 40 mg oubaina (inhibitor enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze). Nakon dodavanja otopina A i E, uzorci se stavljaju na inkubaciju u vodenom termostatu pri 37°C na 15 minuta. Reakcija se stopira dodavanjem 1 ml stop otopine. Uzorci se ostave 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi reakcija sigurno bila prekinuta, iza čega se mjeri apsorbancija na valnoj dužini od 700 nm.

3.2.3.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina u uzorcima određivane su metodom po Bradfordu, korištenjem pročišćenog BSA kao standarda.

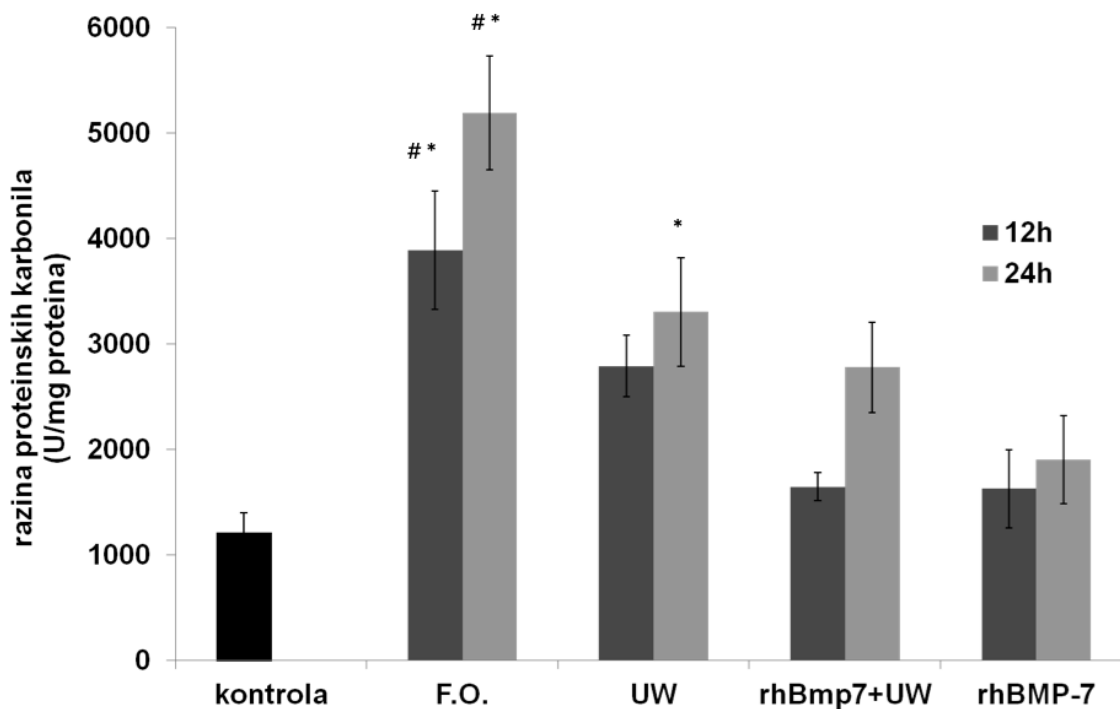
3.3. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci izraženi su kao mjere središnjice i raspršenja. Pri statističkoj obradi podataka korištena je analiza varijance (ANOVA). Razina od $P < 0,05$ smatra se statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalnog programa STATISTICA[®] 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Razina proteinskih karbonila (PCC)

Slika 2. pokazuje izmjerene razine proteinskih karbonila (PCC) u tkivu bubrega nakon tople i hladne ishemije u skupinama fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 i kontroli, kao i u ovisnosti o vremenu trajanja hladne ishemije (12 i 24 sata). Količina proteinskih karbonila PCC je pokazatelj oksidativnog oštećenja proteina uzrokovanog slobodnim radikalima kisika u tkivu. Prvim stupcem na slici prikazana je razina izmjerenog sadržaja proteinskih karbonila (PCC) u zdravom bubregu koji nije podvrgnut hladnoj i toploj ishemiji. U svim skupinama izloženim hladnoj i toploj ishemiji (fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7) razina sadržaja PCC progresivno raste s duljinom trajanja hladne ishemije, na način da je najniža razina sadržaja proteinskih karbonila izmjerena nakon 12 sati hladne ishemije, a najveća nakon 24 sata hladne ishemije.

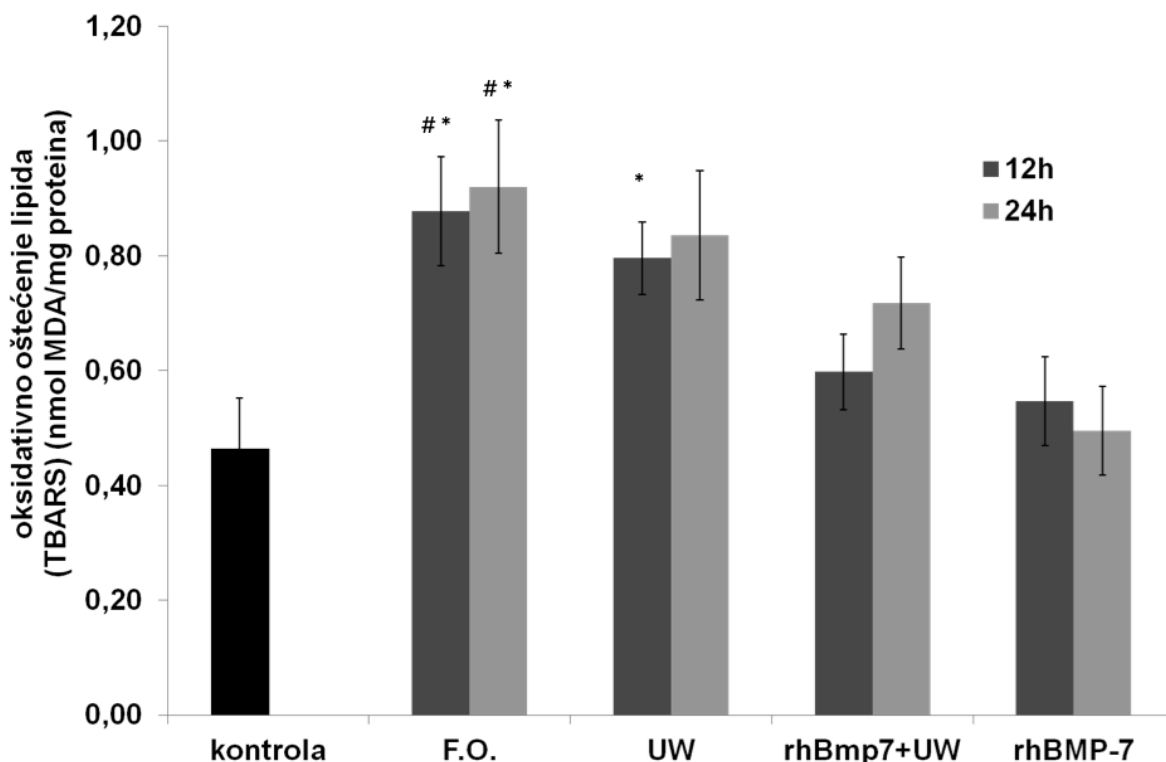


Slika 2. Razina proteinskih karbonila (PCC) (U/mg proteina) u bubregu nakon 12 i 24 sati hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije u skupinama: fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 te kontroli. Kontrolna skupina nije podvrgnuta hladnoj i toploj ishemiji. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti \pm SEM (n = 5). * $P < 0,01$ značajno različito od kontrolne skupine;# $P < 0,05$ značajno različito u odnosu na rhBMP-7 skupinu.

U bubrezima iz skupina fiziološka i UW otopina, razina sadržaja PCC značajno je povišena u odnosu na kontrolu nakon 12 i 24 sata hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije ($P=0,001$; $0,020$). Nema razlike u izmjerenoj razini sadržaja PCC između rhBMP-7 skupine i kontrole nakon oba vremenska perioda hladne ishemije i tople ishemije.

4.2. Oksidativno oštećenje lipida (TBARS)

Slika 3. pokazuje izmjerene razine oksidativnog oštećenja lipida (TBARS) u tkivu bubrega nakon tople i hladne ishemije u skupinama fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 i kontroli, kao i u ovisnosti o vremenu trajanja hladne ishemije (12 i 24 sata). Količina oksidativnog oštećenja lipida (TBARS) je pokazatelj oksidativnog oštećenja lipida uzrokovanog slobodnim radikalima kisika u tkivu. Prvim stupcem na slici prikazana je razina izmjerenog sadržaja oksidativnog oštećenja lipida (TBARS) u zdravom bubregu, koji nije podvrgnut hladnoj i toploj ishemiji. U tkivu bubrega iz skupina fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, izloženih hladnoj i toploj ishemiji, razina sadržaja TBARS povišena je u odnosu na kontrolnu skupinu. U tkivu bubrega iz skupine rh-BMP-7 nema razlike u izmjerenoj razini sadržaja TBARS-a u odnosu na kontrolnu skupinu. U svim skupinama podvrgnutim hladnoj i toploj ishemiji razina sadržaja TBARS-a ne mijenja se u ovisnosti o vremenu trajanja hladne ishemije (12 ili 24 sata).

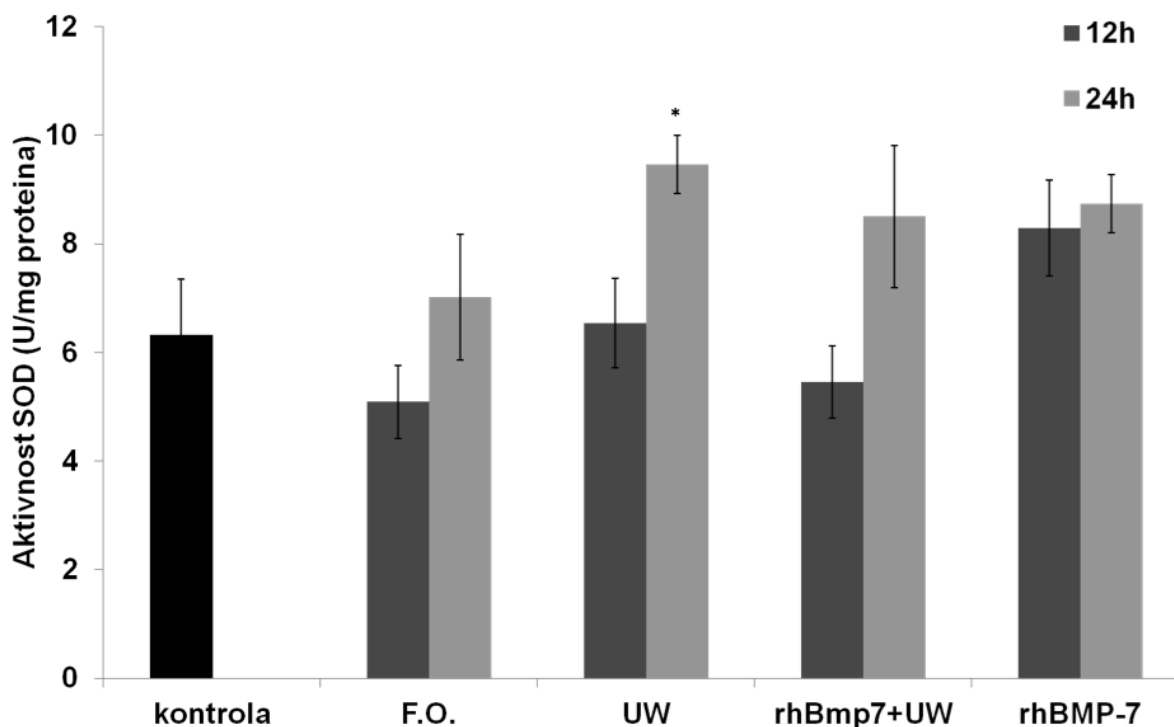


Slika 3. Razina oksidativnog oštećenja lipida (TBARS) (nmol MDA/mg proteina) u u bubregu nakon 12 i 24 sati hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije u skupinama: fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 te kontroli. Kontrolna skupina nije podvrgnuta hladnoj i toploj ishemiji. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti \pm SEM (n = 5). * $P < 0,01$ značajno različito od kontrolne skupine;# $P < 0,05$ značajno različito u odnosu na rhBMP-7 skupinu.

U bubrezima iz skupine fiziološka otopina, razina sadržaja TBARS značajno je povišena u odnosu na kontrolnu i rhBMP-7 skupinu nakon 12 i 24 sata hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije ($P < 0.001$; 0.001). U bubrezima iz skupine UW otopine, razina sadržaja TBARS značajno je povišena u odnosu na kontrolnu skupinu nakon 12 sati hladne ishemije, dok nakon 24 sata hladne ishemije ne postoji značajna razlika ($P = 0.001$). Nema razlike u izmjerenoj razini sadržaja TBARS između rhBMP-7 skupine i kontrole nakon oba vremenska perioda hladne ishemije i tople ishemije.

4.3. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

Slika 4. pokazuje izmjerene razine aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u tkivu bubrega nakon tople i hladne ishemije u skupinama fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 i kontroli, kao i u ovisnosti o vremenu trajanja hladne ishemije (12 i 24 sata). Količina aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) je pokazatelj antioksidativnog kapaciteta tkiva bubrega nakon oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima kisika u tkivu. Prvim stupcem na slici prikazana je razina izmjerene aktivnosti SOD u zdravom bubregu, koji nije podvrgnut hladnoj i toploj ishemiji. U skupinama fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, izloženih hladnoj i toploj ishemiji, razina aktivnosti SOD progresivno raste s duljinom trajanja hladne ishemije, na način da je najniža aktivnost SOD izmjerena nakon 12 sati hladne ishemije, a najveća nakon 24 sata hladne ishemije. U skupini rhBMP-7 razina aktivnosti SOD nije ovisila o vremenu trajanja hladne ishemije.

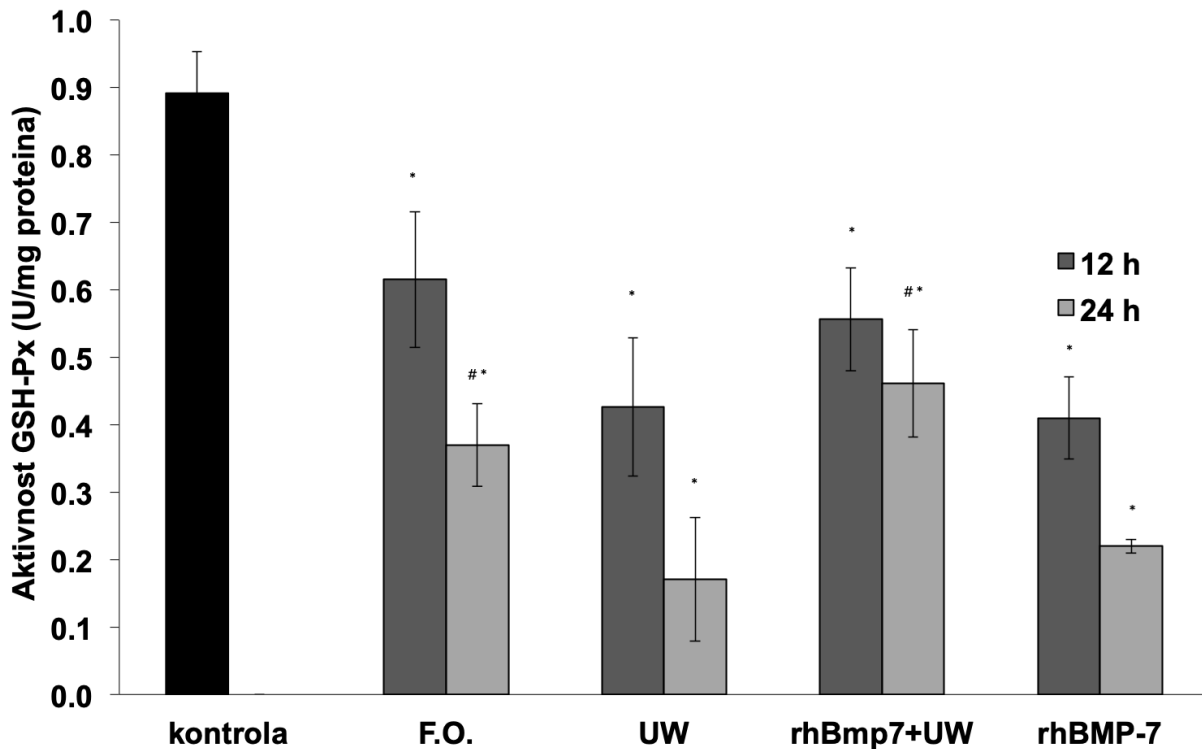


Slika 4. Razina aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) (U/mg proteina) u bubregu nakon 12 i 24 sati hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije u skupinama: fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 te kontroli. Kontrolna skupina nije podvrgnuta hladnoj i toploj ishemiji. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti \pm SEM (n = 5). * $P < 0,01$ značajno različito od kontrolne skupine;# $P < 0,05$ značajno različito u odnosu na rhBMP-7 skupinu.

Razina aktivnosti SOD nakon 24 sata hladne ishemije i 30 minuta tople ishemije značajno je povišena u bubrezima iz skupine perfundirane UW otopinom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P > 0.005$). Nema statistički značajnije razlike u izmjerenoj aktivnosti SOD između rhBMP-7 i kontrole nakon 12 i 24 sata hladne i 30 minuta tople ishemije.

4.4. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px)

Slika 5. pokazuje izmjerene razine aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) u tkivu bubrega nakon tople i hladne ishemije u skupinama fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 i kontroli, kao i u ovisnosti o vremenu trajanja hladne ishemije (12 i 24 sata). Količina aktivnosti glutation peroksidaze (GSh-Px) je pokazatelj antioksidativnog kapaciteta tkiva bubrega nakon oštećenja uzrokovanog djelovanjem slobodnih kisikovih radikala. Prvim stupcem na slici prikazana je razina izmjerene aktivnosti GSH-Px u zdravom bubregu, koji nije podvrgnut hladnoj i toploj ishemiji. U svim skupinama izloženih hladnoj i toploj ishemiji fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 razina aktivnosti GSH-Px smanjuje se s duljinom trajanja hladne ishemije. Također u svim skupinama izloženim toploj i hladnoj ishemiji razina aktivnosti GSH-PX niža je od one zabilježene u kontrolnoj skupini.

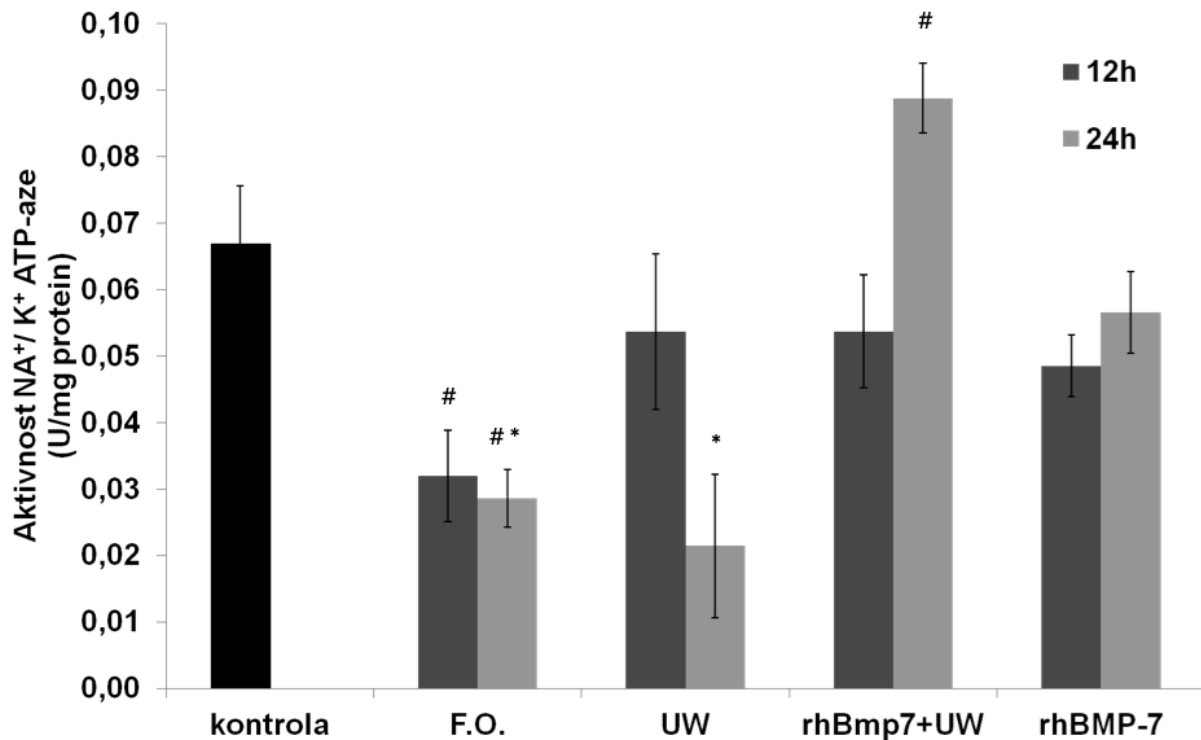


Slika 5. Razina aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px) (U/mg proteina) u bubregu nakon 12 i 24 sati hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije u skupinama: fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 te kontroli. Kontrolna skupina nije podvrgnuta hladnoj i toploj ishemiji. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti \pm SEM (n = 5). * P < 0,01 značajno različito od kontrolne skupine;# P < 0,05 značajno različito u odnosu na rhBMP-7 skupinu.

U tkivu bubrega iz skupina fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7, razina aktivnosti GSH-Px statistički je značajno snižena u odnosu na kontrolnu skupinu nakon 12 i 24 sata hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije ($P < 0.001$). Aktivnost GSH-Px u bubrezima iz skupine rhBMP-7, značajno je snižena u odnosu na skupine perfundirane fiziološkom otopinom i rhBMP-7 +UW otopinom nakon hladne ishemije u trajanju od 24 sata ($P = 0.025, 0.028$).

4.5. Aktivnost Na/K ATP-aze

Slika 6. pokazuje izmjerene razine aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze u tkivu bubrega nakon tople i hladne ishemije u skupinama fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 i kontroli, kao i u ovisnosti o vremenu trajanja hladne ishemije (12 i 24 sata). Količina aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze je pokazatelj ishemijskog oštećenja tkiva. Prvim stupcem na slici prikazana je razina izmjerene aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze u zdravom bubregu koji nije podvrgnut hladnoj i toploj ishemiji. Kod bubrega iz skupine fiziološka otopina te UW otopina, aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze smanjuje se s duljinom trajanja hladne ishemije, dok kod bubrega iz skupina rhBMP-7 +UW, aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze raste s vremenom trajanja hladne ishemije.



Slika 6. Razina aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze (U/mg proteina) u bubregu nakon 12 i 24 sati hladne ishemije te 30 minuta tople ishemije u skupinama: fiziološka otopina, UW otopina, rhBMP-7 +UW, rhBMP-7 te kontroli. Kontrolna skupina nije podvrgnuta hladnoj i toploj ishemiji. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti \pm SEM (n = 5). * $P < 0,01$ značajno različito od kontrolne skupine;# $P < 0,05$ značajno različito u odnosu na rhBMP-7 skupinu.

Aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze značajno je snižena u odnosu na kontrolnu skupinu, u bubrezima iz skupine fiziološka otopina te UW otopina nakon hladne ishemije u trajanju od 24 sata ($P < 0.001$). Aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze, značajno je smanjena u tkivu bubrega u skupini perfundiranoj fiziološkom otopinom u odnosu na rhBMP-7 skupinu nakon oba perioda hladne ishemije ($P = 0.018$; 0.013). Isto tako, aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze u bubrezima iz skupine rhBMP-7 +UW značajno je povećana u odnosu na rhBMP-7 skupinu nakon perioda hladne ishemije u trajanju od 24 sata ($P < 0.005$). Nema razlike u izmjerenoj aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze između rhBMP-7 skupine i kontrole nakon oba vremenska perioda hladne i tople ishemije.

5. DISKUSIJA

Istraživanje je pokazalo kako bubrezi, koji su bili pohranjeni u rhBMP-7 otopini ili kombinaciji University of Winsonsin i rhBMP-7 otopine tijekom hladne i tople ishemije, imaju manje oštećenje proteina i lipida nastalo djelovanjem slobodnih kisikovih radikala u odnosu na bubrege pohranjene u fiziološkoj i UW otopini. Iako hladna ishemija, odnosno hlađenje tkiva bubrega na +4°C, smanjuje energetske potrebe tkiva te usporava proces njegova propadanja, istovremeno dovodi i do manjka kisika unutar tkiva te nastanka velike količine slobodnih kisikovih radikala. Slobodni kisikovi radikali uzrokuju lipidnu peroksidaciju stanične membrane te razgradnju staničnih proteina, uzrokujući pritom velika oštećenja tkiva bubrega. Upravo iz toga razloga, otopine za čuvanje bubrega imaju ključnu ulogu u njegovoj zaštiti za vrijeme trajanja hladne i tople ishemije. Zlatni standard otopine u čuvanju bubrega danas predstavlja UW otopina. Naši rezultati pokazuju kako razine proteinskih karbonila te oksidativnog oštećenja lipida rastu proporcionalno s duljinom trajanja hladne ishemije. Pritom treba naglasiti kako su najniže razine oštećenja nakon 12 i 24 sata hladne ishemije zabilježene u bubrega čuvanih u rhBMP-7 otopini, što je u skladu s rezultatima dosada provedenih istraživanja (10,29). Kako bi se bubreg zaštitio od djelovanja slobodnih kisikovih radikala, unutar tkiva bubrega dolazi do aktivacije antioksidativnih enzima, uključujući SOD te GSH-Px. Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako razine aktivnosti SOD rastu proporcionalno s vremenom trajanja hladne i tople ishemije, pri čemu ne postoji značajnija razlika u aktivnosti SOD u kontrolnoj skupini u odnosu na bubrege iz preostalih skupina. Jedini izuzetak je značajnije povišena aktivnost SOD u skupini bubrega iz UW otopine, nakon 24 sata hladne ishemije, u odnosu na kontrolnu skupinu. Isto tako nije zabilježena značajnija razlika aktivnosti SOD, u oba perioda hladne i tople ishemije u rhBMP-7 skupini, u odnosu na preostale skupine. GSH-Px, drugi je antioksidativni enzim, čija je aktivnost analizirana u ovom istraživanju. Rezultati dosadašnjih istraživanja aktivnosti GSH-

Px u hladnoj ishemiji bubrega su varijabilni te se podosta razlikuju (10,30). U našem istraživanju, aktivnost GSH-Px smanjuje se s duljinom trajanja hladne i tople ishemije, unutar svih ispitivanih skupina. Isto tako, aktivnost GSH-PX značajno je smanjena u svim skupinama u odnosu na kontrolu tijekom oba perioda hladne i tople ishemije. Važno je naglasiti, kako nije zabilježena značajna razlika u aktivnosti GSH-Px između UW i rhBMP-7 skupine. Za pravilnu interpretaciju rezultata, važno je reći, kako ispitivana UW otopina sadrži glutation kao jednu od svojih osnovnih sastavnica. Iako su neka od prijašnjih istraživanja ukazivala na povećanu aktivnost SOD i GSH-Px u bubrega čuvanih u rhBMP-7 otopini u odnosu na UW otopinu, naše istraživanje pokazuje kako nema značajnije razlike u njihovoj aktivnosti (10). Smanjena aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze jedan je od najranijih pokazatelja ishemije tkiva, s obzirom da se prilikom nedostatka energije u tkivu najprije oštećuju i prestaju s radom transportni mehanizmi stanica. U našem istraživanju aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze u skupini bubrega UW otopina, značajno se smanjila u odnosu na kontrolnu skupinu nakon ishemije u trajanju od 24 sata. Za razliku od UW otopine, aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze nije bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu u rh BMP-7 skupini. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako primjena rhBMP-7 otopine, za vrijeme trajanja hladne i tople ishemije bubrega, smanjuje oštećenja tkiva nastalog djelovanjem slobodnih kisikovih radikala uspješnije od UW otopine te preostalih otopina. RhBMP-7 otopina pokazala se uspješnijom od UW otopine i u očuvanju aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze nakon hladne ishemije u trajanju od 24 sata. Kada je riječ o aktivnosti antioksidativnih enzima, SOD i GSH-Px, ne postoji razlika između primjene UW ili rh-BMP-7 otopine.

6. ZAKLJUČCI

1. Primjena rhBMP-7 otopine tijekom hladne i tople ishemije, uspješnije čuva tkivo bubrega od oksidativnog oštećenja proteina i lipida te Na^+/K^+ ATP-aznu aktivnost u odnosu na UW otopinu

2. Primjena rhBMP-7 otopine tijekom hladne i tople ishemije ne razlikuje se od UW otopine u djelovanju na aktivnost antioksidativnih enzima, GSH-Px te SOD.

Efikasnijim smanjivanjem oksidativnog oštećenja stanica, primjena rhBMP-7 tijekom procesa transplantacije bubrega mogla bi smanjiti učestalost odbacivanja presatka, kao i nastanka odgođene funkcije presatka. Na taj način mogao bi se poboljšati ishod transplantacija bubrega, a samim time i uspješnost liječenja kroničnog zatajenja bubrega. Obzirom na rezultate našeg istraživanja, kao i mnogih istraživanja provedenih na ovu temu ranije, postoji velika mogućnost skorije rhBMP-7 kliničke primjene u liječenju bubrežnog oštećenja, iako su daljnja istraživanja na ljudskoj populaciji nužna.

7. SAŽETAK

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda jedan je od najvažnijih uzroka oslabljene funkcije transplantiranog bubrega. Dosad su identificirani mnogi čimbenici, koji mogu povećati vjerojatnost njezina nastanka, a jedan od najvažnijih je način skladištenja bubrega, odnosno duljina trajanja hladne ishemije. Osnovni uzrok oštećenja tkiva u hladnoj ishemiji je nedostatak kisika, koji dovodi do smanjenja koncentracije adenzin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP-a) te slabljenja aktivnosti Na/K-ATP-aze (Na/K crpke). Puno kompleksniji i teži oblik oštećenja tkiva nastaje ponovnom uspostavom cirkulacije, odnosno reperfuzijom, prilikom koje dolazi do pojačanog ulaska kisika u stanice te stvaranja velike količine slobodnih kisikovih radikala. Njihovo nakupljanje unutar tkiva uzrokuje oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Ljudski organizam djelomično je zaštićen od djelovanja slobodnih kisikovih radikala pomoću vlastitih antioksidativnih enzimatskih sustava, poput superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GSH-Px) te katalaze. Kako bi se spriječio nastanak navedenih oštećenja, u kliničkoj se praksi za vrijeme trajanja ishemije bubrega koriste različite otopine za njegovo čuvanje. Cilj ovog rada bio je ispitati da li primjena koštanog morfo-genetskog proteina 7 (engl. *bone morphogenetic protein 7*, BMP-7) smanjuje oštećenje tkiva bubrega tijekom hladne i tople ishemije uspješnije od UW otopine te da li je dodavanjem BMP-7 u UW otopinu oštećenje tkiva manje nego kada se tkivo ispire samo s UW otopinom. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako primjena rhBMP-7 tijekom hladne i tople ishemije, uspješnije čuva tkivo bubrega od oksidativnog oštećenja proteina i lipida te NA^+/K^+ ATP-aze u odnosu na UW otopinu, dok istovremeno ne postoji značajnija razlika u aktivnosti antioksidativnih enzima, GSH-Px te SOD.

Ključne riječi: BMP-7; Hladna ishemija; Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda; Slobodni kisikovi radikali, Transplantacija bubrega

8. SUMMARY

Ischemic-reperfusion injury is important cause of transplanted kidney decreased function. So far many risk factors have been identified, which may increase the probability of its occurrence, the most important one is duration of the cold ischemia. The main cause of tissue damage in cold ischemia is lack of oxygen, which leads to a decreased concentration of adenosine triphosphate (ATP) and decrease in Na/K-ATPase activity. More complex and severe form of tissue damage is caused by re-establishment of circulation, known as reperfusion, which leads to increased oxygen level in the cells and creation of reactive oxygen species (ROS). ROS cause damage of the DNA, proteins, and lipids of cell membrane. Human body is partially protected from effects of ROS by its own antioxidant enzymatic systems, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase. In order to prevent occurrence of these impairments, different organ preservation solutions can be used during cold ischemia period. Aim of this study was to examine whether the application of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) reduces kidney damage during cold and warm ischemia more successfully than UW solution, and whether the adding of BMP-7 into UW solution will prevent tissue damage more efficiently than UW solution itself. The results of this study demonstrated that rhBMP-7, compared with UW solution, better preserves kidney tissue after cold and warm ischemia, decreasing the levels of LPO, PCC and preserving the damaging of Na^+/K^+ ATP-ase. However, there was no significant difference in antioxidative enzymes activity levels between these two groups.

Key words: BMP-7; Cold ischemia; Ischemia – reperfusion injury; Reactive oxygen species, Kidney transplantation

9. LITERATURA

- 1) Celic T, Omrcen H, Spanjol J, Bobinac D. Mechanisms of Bone Morphogenetic Protein - 7 Protective Effect Against Cold Ischemia Induced Renal Injury in Rats. *Transplant Proc* 2018;50:3822-30.
- 2) Hoogland ER, Snoeijs MG, van Heurn LW. DCD Kidney Transplantation: Results and Measures to Improve Outcome. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:177-82.
- 3) Gavela ME, Pallardó MLM, Sancho CA, Beltran Catalan S, Kanter Berga J, Avila Bernabeu A et al. Delayed Graft Function after Renal Transplantation: An Unresolved Problem. *Transplant Proc* 2011;43:2171-3.
- 4) Damjanovic T. Učinak trajanja hladne ishemije na odgođenu funkciju bubrežnog presatka. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Medicinski fakultet Osijek.2017.
- 5) Philipponnet C, Aniort J, Garrouste C, Kemeny JL, Heng AE. Ischemia Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: A case report. *Medicine*.2018;97(52):e13650.
- 6) Nieto-Ríos JF, Ochoa-García CL, Serna-Campuzano A, Benavides Hermosa B, Calderon-Puentes LL, Aristizabal-Alzate A et al. Time of Cold Ischemia and Delayed Graft Function in a Cohort of Renal Transplant Patients in a Reference Center. *Indian J Nephrol* 2019;29:8-14.
- 7) Lakunina, V.A., Burnysheva, K.M., Mitkevich, V.A, Makarov A.A, Petrushanko I.Y. Changes in the Receptor Function of Na,K-ATPase During Hypoxia and Ischemia. *Mol Biol* 2017;51:148-54.
- 8) Voigt, MR, DeLario GT. Perspectives on Abdominal Organ Preservation Solutions: A Comparative Literature Review. *Progress in Transplantation* 2013;23:383–91.
- 9) Yoshida M, Honma S. Regeneration of Injured Renal Tubules. *J Pharmacol Sci* 2014;124:117-22.

- 10) Celic T, Spanjol J, Grsković A. Bone Morphogenetic Protein-7 Reduces Cold Ischemic Injury in Rat Kidney. *Transplant Proc* 2011;43:2505-9.
- 11) Lund RJ, Davies MR, Hruska KA. Bone Morphogenetic Protein-7: an Anti-Fibrotic Morphogenetic Protein with Therapeutic Importance in Renal Disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:31-6.
- 12) Manson SR, Niederhoff RA, Hruska KA, Austin PF. Endogenous BMP-7 is a Critical Molecular Determinant of the Reversibility of Obstruction-Induced Renal Injuries. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;301:F1293-302.
- 13) Pérez-Canga JL, Martín Penagos L, Ballesteros Diego R, Valero San Cecilio R, Rodrigo Calabria E, Belmar Vega L et al. Effect of Cold Ischemia Time on Kidney Graft Function and Survival: Differences Between Paired Kidney Transplants From the Same Donor. *Transplant Proc* 2019;51:321-3.
- 14) Marumo T, Hishikawa K, Yoshikawa M, Fujita T. Epigenetic Regulation of BMP7 in the Regenerative Response to Ischemia. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1311–20.
- 15) Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012;298:229-317.
- 16) Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Comprehensive Physiology* 2016;7:113–70.
- 17) Ponticelli CE. The impact of Cold Ischemia Time on Renal Transplant Outcome. *Kidney International* 2015;87:272–5.
- 18) Malek M, Nematbakhsh M. Renal Ischemia/Reperfusion Injury; from Pathophysiology to Treatment. *J Renal Inj Prev* 2015;4:20–7.
- 19) Halazun KJ, Al-Mukhtar A, Aldouri A, Willis S, Ahmad N. Warm Ischemia in Transplantation: Search for a Consensus Definition. *Transplantation Proceedings* 2007;39:1329–31.

- 20) Vinson AJ, Rose C, Kiberd BA, Ayodele O, Kim SJ, Alwayn I et al. Factors Associated With Prolonged Warm Ischemia Time Among Deceased Donor Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct* 2018;4:e342.
- 21) Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici. *Patofiziologija*. 7. izd. Knjiga prva. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
- 22) Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:287-99.
- 23) Ivanac-Jankovic R, Coric M, Furic-Cunko V, Lovcic V, Basic-Jukic N, Kes P. BMP-7 Protein Expression is Downregulated in Human Diabetic Nephropathy. *Acta clin Croat* 2015;54:164-8.
- 24) Manson SR, Austin PF, Guo Q, Moore KH. BMP-7 Signaling and its Critical Roles in Kidney Development, the Responses to Renal Injury, and Chronic Kidney Disease. *Vitam Horm* 2015;99:91-144.
- 25) Lund RJ, Davies MR, Hruska KA. Bone Morphogenetic protein-7: an anti-fibrotic Morphogenetic Protein with Therapeutic Importance in Renal Disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:31-6.
- 26) Li RX, Yiu WH, Tang SC. Role of Bone Morphogenetic Protein-7 in Renal Fibrosis. *Front Physiol* 2015;6:114.
- 27) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric acid Reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
- 28) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
- 29) Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A et al. Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) Reduces Severity of Injury After Ischemic Acute Renal Failure in rat. *J Clin Invest* 1998;102:202–14.

30) Cakir M, Duzova H, Baysal I, Gül CC, Kuşcu G, Kutluk F et al. The Effect of Hypericum Perforatum on Kidney Ischemia/Reperfusion Damage. Ren Fail 2017;39:385–91.

10. ŽIVOTOPIS

Alojzije Lacković rođen je 23.12.1994 u Rijeci. Po završetku Osnovne škole Fran Franković na Drenovi, upisuje Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci. Studij Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci upisuje 2013. godine. Od akademske godine 2014./2015. do kraja studija obavlja dužnost demonstratora na Zavodu za anatomiju, a od akademske godine 2016./2017. do kraja studija obavlja dužnost i demonstratora na Katedri za internu medicinu. Tijekom studija aktivno i pasivno sudjeluje na brojnim kongresima te se bavi i znanstvenim radom. Aktivno se služi engleskim jezikom.