



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ivana Pešić

**PATOFIZIOLOŠKI ASPEKTI GLOMERULSKIH I
TUBULOINTESTICIJSKIH BUBREŽNIH OBOLJENJA:
PROTEOMSKI PRISTUP**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Vladisav Stefanović

Niš, 2011. godina

*Ničega se u životu ne treba plašiti.
Potrebno je samo da se razume.*

Maria Curie

Posebno zahvaljujem

- *Mentoru, prof. dr Vladisavu Stefanoviću, na vremenu, strpljenju i nesebičnom pružanju znanja,*
- *Prof. dr Gerhardu A. Mileru i prof. dr Klaudiji A. Miler, na prijateljstvu, stručnoj i nesebičnoj podršci i ukazanoj prilici za dalje stručno usavršavanje na Institutu za nefrologiju i reumatologiju, Medicinskog Univerziteta u Getingenu, Nemačka*
- *Prof. dr Hasanu Dihaziju, na stručnoj i nesebičnoj podršci, kao i svim korisnim i prijateljskim savetima od početka mog istraživačkog boravka na Institutu za nefrologiju i reumatologiju, Medicinskog Univerziteta u Getingenu, Nemačka*
- *Prof. dr Milanu Višnjicu na višegodišnjoj pomoći i podršci ukazanim prilikama u nastojanju da proširim svoja znanja,*
- *Prof. dr Dušici Pavlović, na stručnoj i moralnoj podršci koju mi je pružala u toku mog celokupnog akademskog školovanja,*
- *Prof. dr Veri Todorović, na stručnoj pomoći i podršci*
- *Prof. dr Ljubinki Janković-Veličković na dugogodišnjoj saradnji i stručnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije,*
- *Docentu dr Tatjani Jeftović-Stojmenov i docentu dr Ivanu Jovanoviću, na stručnoj podršci i pomoći*
- *Svojim nastavnicima i osoblju katedre za Patofiziologiju na kolegijalnoj i stručnoj podršci,*
- *Elki Brunst-Knublih, na prijateljskoj i stručnoj pomoći tokom izrade ove disertacije*
- *Svojim kolegama iz laboratorije za proteomska istraživanja, Asimi Bibi, Marvi Eltoveisi i Gri Dihazi na nesebičnoj prijateljskoj saradnji i podršci*
- *Miletu Ž. Randeloviću, diplomiranom inženjeru elektronike, na dragocenoj pomoći u tehničkoj obradi ove disertacije,*
- *Svojoj porodici, roditeljima i sestri za ogromno strpljenje, vremenu koje su uvek imali za mene, bezuslovno razumevanje i podršku tokom mog celokupnog akademskog rada i usavršavanja*

I Autor

Ime i prezime:	Ivana Pešić
Datum i mesto rođenja:	25.07.1980. Niš
Sadašnje zaposlenje:	Saradnik u nastavi na katedri za Patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu

II Doktorska disertacija

Naslov:	Patofiziološki aspekti glomerulskih i tubulointesticijskih bubrežnih oboljenja: proteomski pristup
Broj stranica:	131
Broj šema / slika:	41
Broj tabela:	6
Broj grafikona:	10
Broj bibliografskih podataka:	235
Ustanova i mesto gde je rad izrađen:	Odeljenje za reumatologiju i nefrologiju Interna medicina, Medicinski fakultet u Getingenu, Nemačka
Naučna oblast:	Molekularna medicina, patofiziologija
Mentor:	Prof. dr Vladisav Stefanović

III Ocena i odbrana

Datum prijave teme:	21.12.2010.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije:	04-MM-8/06 21.04.2011.
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:	1. Prof. dr Vladmila Bojanić, predsednik, 2. Prof. dr Vladisav Stefanović, član, 3. Docent dr Tatjana Jeftović-Stojmenov
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:	1. Prof. dr Vladmila Bojanić, predsednik, 2. Prof. dr Vladisav Stefanović, mentor i član, 3. Prof. dr Vera Todorović, član sa Stomatološkog fakulteta u Pančevu, 4. Prof. dr Gerhard A. Miler, počasni član sa Medicinskog fakulteta u Getingenu, Nemačka, 5. Prof. dr Hasan Dihazi, počasni član sa Medicinskog fakulteta u Getingenu, Nemačka
Datum odbrane doktorske disertacije:	15.06.2011.

Naučni doprinos disertacije

- **Pešić I**, Stefanović V, Mueller GA, Mueller CA, Čukuranović R, Jahn O, Bojanić V, Koziolk M, Dihazi H. Identification and validation of six proteins as markers for endemic nephropathy. Journal of Proteomics 2011; in press.

Lista skraćena

2D-DIGE	— dvodimenzionalna diferencijalna elektroforeza u gelu
2-DE	— dvodimenzionalna elektroforeza u gelu
8-OHdG	— 8-hydroxydeoxyguanosine, oksidisana forma DNK nukleozida
AA	— aristolohijska kiselina, ekstrakt biljaka iz vrste <i>Aristolochia</i>
AA1	— aristolohijska kiselina 1, 8-metoksi-6-nitro-fenantro-(3,4-d)-1,3-dioksolo-5-karboksilna kiselina
AA1-OTA	— kombinovani tretman AA1 i OTA-om
AA2	— aristolohijska kiselina 2, 6-nitro-fenantro-(3,4-d)-1,3-dioksolo-5-karboksilna kiselina
ACE inhibitori	— angiotensin-convertujući enzim inhibitori
ACTA2	— alfa aktin glatkih mišića
AGEs	— Advanced glycation end-products, krajnji produkti glikacije
AKI	— acute kidney injury, akutno oštećenje bubrega
ALB	— albumin
AMBP	— alfa-1-mikroglobulin
ANOVA	— analiza varijanse
APOH	— beta-2-glikoprotein
ARE	— antioksidativni regulatorni element
AUC	— Area under the curve, površina ispod linije
B2M	— beta-2-mikroglobulin
BCL-2	— Regulatorni apoptotični protein
BMI	— body mass index, indeks telesne mase
BSA	— Kravlji serum albumin
CDKN1A	— Cyclin-dependent kinase inhibitor 1, inhibitor ciklin zavisne kinaze
CFB	— komplement faktor B
CHAPS	— 3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonijum]-1-propan-sulfonat
CI	— interval pouzdanosti
COX1, COX2	— Prostaglandin H sintetaza, ciklooksigenaza
CTGF	— Connective tissue growth factor, faktor rasta vezivnog tkiva
Cy2	— fluorescentna boja talasne dužine 473 nm
Cy3	— fluorescentna boja talasne dužine 532 nm
Cy5	— fluorescentna boja talasne dužine 635 nm
CYP	— citohrom P450 (CYP) 1A1/2
dA-AA1	— 7-(deoksi-adenozin-N ₆ -il)-aristolaktam-1
dA-AA2	— 7-(deoksi-adenozin-N ₆ -il)-aristolaktam-2
DAPI	— 4'-6-Diamidino-2-phenilindol
Delta 2D 3.4 software	— Program za odradu proteomskih mapa
dG-AA1	— 7-(deoksi-guanozin-N ₂ -il)-aristolaktam 2
DM	— Diabetes mellitus, šećerna bolest
DN	— Dijabetesna nefropatija
DTT	— Ditiotreitol
ECM	— ekstracelularni matriks
eEF1A-1	— Elongacioni faktor 1-alfa 1
EGR1	— Early growth response protein 1, protein ranog odgovora ćelijskog rasta

Eif5A	— Eukariotski translacioni inicirajući faktor
EN	— endemska nefropatija
ERKs	— Ekstracelularnim signalom regulisane kinaze
EuroKup/HKUPP	— Evropska i internacionalna organizacija za istraživanje urinarnog u bubrežnog proteoma
FCS	— Foetal calf serum, komponenta standardnog medija za kultivaciju ćelija
FN1	— fibronektin
FOS	— Protoonkogen c-FOS
GC	— vitamin D vezujući protein
GN	— glomerulonefritis
GraphPrism software	— Program za statističku obradu podataka
H2-ALPHA	— Alpha-tubulin isotype H2-alpha, Alfa izotop H2 tubulin
HDAC	— Histon deacetilaza
HEN	— zdravi ispitanici koji naseljavaju endemska područja
HGER	— zdravi ispitanici koji naseljavaju ne-endemska područja
HIST1H1C	— Histon H1.2
HIST1H2AC	— Histon H2A tip 1-C
HIST1H3D	— Histon H3.1
HIST1H3E	— Histon H3.1
HIST1H4B	— Histon H4
HIST1H4C	— Histon H4
HK2 ćelije	— sekundarna kultura humanih ćelija proksimalnih tubula, HK2 soj
HLE	— humana leukocitna elastaza
HP	— haptoglobin
HPX	— hemopeksin
IARC	— Međunarodna agencija za istraživanje kancera
IEF	— izoelektrično fokusiranje
IGF	— Insulin-like growing factor, insulinu sličan faktor rasta
Image J software	— Program za obradu digitalnih podataka
iNOS	— inducibilna azot oksid sintetaza
IPG	— gel trake za izoelektrično fokusiranje
iRNK	— informaciona ribonukleinska kiselina
K-ALPHA-1	— Tubulin alpha-1B chain, alfa-1B lanac tubulina
KDOQI	— National Kidney Foundation - the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, nacionalna fondacija za bubrežne bolesti
KLF10	— Krueppel-like factor 10
LCN2	— Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, neutrofilni lipokain
LMAN2	— vezikularni integralni membranski protein
MALDI-TOF MS	— Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry, maseni spektrometar
MALDI-TOF-TOF-MS	— Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry, maseni spektrometar
MAPKs	— Mitogen aktivirane protein kinaze
MASCOT PMF software	— Program za online pretragu peptidnih i proteinskih baza
MCL-1	— antiapoptotični član BCL-2 familije
MTT	— 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

MYC	— Myc protoonkogen protein
N	— broj ispitanika
NAA	— nefropatija aristolohijske kiseline
NCBI	— baza podataka za identifikaciju proteina
Ndfus1	— NADH-ubikvinon oksidoreduktaza 75 kDa subjedinica, mitochondrijalna forma
NECAP1	— Nukleoprotein
NF-kB	— nuklearni faktor, kapa B
NQO1	— NAD(P)H:kvinon oksidoreduktaza
Nrf2	— nuklearni transkripcioni eritroidni faktor 2 p45 vezan faktor 2
NS	— nefroskleroza
ORP 150	— HYOU1, Hipoksijom regulisan protein 1
OTA	— Ohratoksin A
p	— stepen verovatnoće
p38	— Mitogen aktivirana protein 38 kinaza
PAGE	— poliakrilamid gel elektrogoreza
PARK7	— Protein DJ-1
PBS	— fosfatna pufferisana so
PGHS	— Prostaglandin-H sintaza
pI	— izoelektrična tačka
PMF	— peptide mass fingerprint, maseni peptidni spektar
POR	— NADPH:CYP reduktaza
POT1	— DNK telomerni vezujući protein
PRDX1	— Peroksiredoksin 1
PRDX6	— Peroksiredoksin 6
PSP/JNK	— C-SEP N-terminalne kinaze
Quantum 286	— vrsta hranljivog medijuma
RAB5A	— Ras-zavisani protein Rab-5A
RAS	— Ras-specific guanin nucleotide-releasing factor 2, protoonkogen RAS
RBP4	— retinol vezujući protein
ROC kriva	— Receiver Operating Characteristic curve, ROC kriva
SAPK	— Stres aktivirane protein kinaze
SD	— standardna devijacija
SDS	— Sodijum dodecil sulfat
SERPINA1	— alfa-1-antitripsin
Sn	— Senzitivnost
SOD1	— superoksid dizmutaza [Cu-Zn]
SOD2	— Mitochondrijalna superoksid dizmutaza
Sp	— Specifičnost
Swiss-Prot	— baza podataka za identifikaciju proteina
TGF-β	— Tumor growing factor beta, tumorski faktor rasta beta
TK173 ćelije	— sekundarna kultura humanih fibroblasta, TK173 soj
TP53	— Cellular tumor antigen p53, ćelijski tumor antigen p53
Tris-HCl	— tris(hidroksimetil)aminometan, pufferizovani rastvor
Triton X-100	— nejozinirajući surfaktant sa redukujućim dejstvom

TTR	— transtiretin
TUBA-1	— Tubulin alpha-1 chain, alfa-1 lanac tubulina
TUBA-3	— Tubulin alpha-3 chain, alfa-3 lanac tubulina
Tween-20	— Polisorbit 20, deterdžent
Ube2N	— Ubikvitin konjugujući enzim E2 N
UUTT	— upper urothel tract tumour, tumor gornjih urotelnih puteva
VCL	— Vinkulin
VEGF	— Vezikulatni endotelijani faktor rasta A
VIM	— Vimentin
vs	— u odnosu, prema

Sadržaj

1. UVOD	11
1.1 Glomerulska oboljenja bubrega.....	11
1.1.1 Dijabetesna nefropatija	12
1.2 Tubulointesticijska oboljenja bubrega.....	13
1.2.1 Endemska nefropatija.....	14
1.2.1.1 Aristolohijska kiselina 1 (AA1).....	16
1.2.1.2 Ohratoksin A (OTA)	17
1.2.1 Prerenalno akutno oštećenje bubrega.....	19
1.3 Proteomska istraživanja u nefrologiji.....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1 Pacijenti.....	23
3.2 Kultura humanih ćelija epitela proksimalnih tubula bubrega (HK2 ćelijska kultura) ...	24
3.3 Sakupljanje uzoraka urina	25
3.4 Precipitacija proteina i određivanje koncentracije	25
3.5 Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE)	25
3.6 Bojenje gelova.....	26
3.7 Dvodimenzionalna diferencijalna in-gel elektroforeza (2D-DIGE).....	26
3.8 In-gel digestija i mass spektrometrijska analiza.....	27
3.9 Western blot analiza	27
3.10 Dot blot analiza.....	28
3.11 Test vijabilnosti ćelija (MTT test).....	29
3.12 Imunofluorescentna bojenja ćelija.....	29
3.13 Histološki preparati tkiva tumora bubrega pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovane endemske nefropatije.....	30
3.14 Imunohistologija preparata tkiva	30
3.15 Statistička analiza podataka.....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1 Pacijenti.....	31
4.2 Određivanje koncentracije proteina u urinu korišćenjem rutinskih laboratorijskih metoda	31
4.3 Mapiranje EN i HEN urinarnog proteoma	32
4.4 Komparativna analiza urinarnih proteoma upotrebom 2D-DIGE i identifikacija EN proteinskih markera	36
4.5 Komparativna analiza urinarnih proteoma DN i EN pacijenata upotrebom 2D-DIGE i identifikacija proteinskih markera glomerularnog oštećenja u urinu EN pacijenata ...	39
4.6 Imunološko potvrđivanje identifikovanih EN proteinskih markera.....	42
4.7 Validnost EN markera ispitivana na većem polulacionom uzorku	44
4.8 Test ćelijske vijabilnosti (MTT test)	48
4.9 Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina koji učestvuju u akutnom ćelijskom odgovoru na dejstvo toksina.....	49
4.10 Imunološko potvrđivanje markera oksidativnog stresa u ćelijskim lizatima nakon akutnog izlaganja HK2 ćelija toksinima	63
4.11 Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina koji učestvuju u hroničnom ćelijskom odgovoru na dejstvo toksina.....	65

4.12	Imunološko potvrđivanje markera oksidativnog stresa u ćelijskim lizatima nakon hroničnog izlaganja HK2 ćelija toksinima	73
4.13	Promene u morfologiji tretiranih ćelija	75
4.14	Proteini koji su značajni u ćelijskom odgovoru na dejstvo toksina – imunobojenja ćelija kao metoda ispitivanja postojanja markera intoksikacije i njihove lokalizacije u ćeliji	77
4.15	Imunohistološka bojenja preparata tumora gornjeg urotelijuma pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovane endemske nefropatije.....	80
5.	DISKUSIJA.....	82
5.1	Proteini u urinu pacijenata sa endemskom nefropatijom i zdrave populacije koja živi na područjima endemske nefropatije.....	82
5.2	Urinarni proteinski markeri ranog oštećenja bubrežnog tkiva pacijenata sa endemskom nefropatijom.....	83
5.3	Urinarni proteinski markeri glomerularnog oštećenja u toku razvoja dijabetesne nefropatije – nalaz markera u urinu EN pacijenata kao znak progresije oboljenja.....	86
5.4	Oksidativne lezije humanih tubulocita pri akutnom i hroničnom izlaganju aristolohijskom kiselinom	90
5.5	Pojava fibrotičnih markera u humanim tubulocitima nakon akutnog i hroničnog tretmana aristolohijskom kiselinom	93
5.6	Specifični proteini u lizatu humanih tubulocita kao odgovor na prisustvo aristolohijske kiseline	94
5.7	Ohratoksin A indukuje oksidativni stres pri hroničnom izlaganju humanih tubulocita ...	99
5.8	Pojava markera fibroze u humanim tubulocitima pri akutnom i hroničnom izlaganju ohratoksinom A	100
5.9	Specifični proteini u lizatu humanih tubulocita (HK2) kao odgovor na prisustvo ohratoksina A	101
5.10	Aristolohijska kiselina i Ohratoksin A zajedno indukuju razvoj oksidativnog stresa i fibrozu pri akutnom i hroničnom izlaganju.....	105
5.11	Prisustvo specifičnih proteina u lizatu humanih tubulocita nakon njihovog izlaganja aristolohijskom kiselinom i ohratoksinom A.....	105
5.12	Markeri ćelijske intoksikacije aristolohijskom kiselinom i ohratoksinom u tkivu tumora gornjeg urotelijuma pacijenta sa i bez predhodno dijagnostifikovanim EN-om	107
5.	ZAKLJUČAK	109
6.	LITERATURA.....	111

1. UVOD

Bubrežna oboljenja predstavljaju jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice. Prevalenca hronične bubrežne insuficijencije u Evropi prelazi 10% svih bubrežnih oboljenja [1-4], što je direktna posledica velikog broja obolelih od šećerne bolesti i povišenog krvnog pritiska [5]. Savremene dijagnostičke procedure nisu dovoljno efikasne da se bolest otkrije u ranijem stadijumu i spreči razvoj komplikacija. Ovaj ograničavajući faktor nameće potrebu daljeg istraživanja i traganja za novim molekularnim parametrima koji poseduju mogućnost efikasne primene u ranoj dijagnostici i prevenciji.

1.1 Glomerulska oboljenja bubrega

Oštećenjem normalne strukture glomerula remeti se njihova osnovna funkcija – filtracija krvi i uklanjanje štetnih materija iz organizma (eliminacija toksina i njihovih metabolita, kao i krajnjih produkata metabolizma ugljenih hidrata, masti i belančevina iz krvnog toka i njihova ekskrecija putem urina) uz očuvanje normalnog ćelijskog sastava krvi kao i vitalnih proteina. Po načinu nastanka, glomerularna oštećenja mogu biti akutna i hronična. Ona mogu zahvatiti samo glomerule, ili se pojaviti u okviru sistemskih ili bubrežnih oboljenja (sistemski lupus [6], dijabetes melitus [7], sistemska ili lokalna infekcija). U zavisnosti od težine oštećenja glomerula, glomerulska oboljenja su podeljena u dve osnovne grupe: glomerulonefritisi (zapaljenske reakcije praćene nefrotskim ili nefritskim sindromom) i glomeruloskleroze (progresivno hronično propadanje glomerula usled osnovne bolesti, koje dovode do razvoja hronične bubrežne insuficijencije) [8-10].

Glomerularno oštećenje izaziva pojavu različitih kliničkih sindroma: prisustvo asimptomatske proteinurije i hematurije, masivne rekurentne hematurije, akutnog nefritičkog sindroma, brzog progresivnog glomerulonefritisa, hroničnog nefritičkog sindroma, akutne oligurične bubrežne insuficijencije, nefrotskog sindroma, glomerulonefritisa u sistemskim bolestima (dijabetes melitus) udruženih sa razvojem smanjene glomerularne filtracije, pojavom hipoproteinemije, edema, hipertenzije i hiperlipidemije. Različita oboljenja mogu učestvovati u razvoju oštećenja glomerula: direktna oštećenja bubrežnog tkiva (infekcije, intoksikacije, lokalno toksično dejstvo lekova, poremećaji funkcije imunog sistema, nasledne disfunkcije, idiopatska obolje-

nja) ili u sklopu sistemskih oboljenja (dijabetes melitus, kardiovaskularna oboljenja, oboljenja jetre i digestivnog trakta)[11, 12].

1.1.1 Dijabetesna nefropatija

Šećerna bolest (dijabetes melitus, DM) je najčešći uzrok nastanka hronične bubrežne insuficijencije širom sveta [5, 13, 14]. Njenu najznačajniju komplikaciju predstavlja dijabetesna nefropatija (DN), koja se definiše kao prisustvo perzistentne proteinurije (više od 0,5 g/24h) u dijabetičnih bolesnika sa izraženom retinopatijom i povećanim krvnim pritiskom, a u odsustvu infekcije urotrakta ili srčane slabosti. Oko 10 – 50% svih pacijenata obolelih od DM tip 2 imaju razvijeno oštećenje bubrežnog tkiva u periodu od 15 – 30 godina od nastanka oboljenja [15]. Sve veći broj obolelih posledica je porasta broja starijeg stanovništva, gojaznosti, kao i smanjenoj fizičkoj aktivnosti [16]. Kako su vaskularne komplikacije pacijenata sa DM u terapijskom smislu danas sve manji problem, prevencija oštećenja bubrega kod pacijenata sa DM predstavlja terapijski izazov [17].

Dijabetesna nefropatija se može pojaviti i kod bolesnika sa dijabetes melitusom tip 1 i bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2. Nastanak i razvoj bubrežnog oštećenja je multifaktorijalan. Faktori koji utiču na progresiju oštećenja bubrega u dijabetesnoj nefropatiji najčešće su: genetska predispozicija [18], sistemska hipertenzija [19, 20], aktivacija sistema renin-angiotenzin [21, 22], proteinurija [23, 24], hiperglikemija [25], hiperlipidemija [26, 27], kao i pušenje [28].

Patogeneza dijabetesne nefropatije. Dugotrajno povišene vrednosti glukoze u krvi dovode do nastanka mikro i makrovaskularnih lezija koje uzrokuju razvoj kliničkih komplikacija u target organima (retina, srce, bubreg). Na nivo i brzinu razvoja oštećenja utiču i nasledna predispozicija, hipertenzija nastala kao posledica bubrežnog oštećenja, kao i poremećaji na molekularnom nivou (poremećaj aktivnosti faktora rasta). Dolazi do značajne akumulacije ekstracelularnog matriksa (ECM) sa poremećajem strukture bazalnih membrana u glomerulu i tubulima, kao i proliferacija mezangijalnog matriksa, što neizostavno vodi ka razvoju glomeruloskleroze i tubulointesticijalne fibroze [29]. Ovakve promene remete mehaničku i elektrostatičku funkciju glomerula, što se detektuje u kliničkoj slici poliurijom i mikroalbuminurijom. Sistemska hipertenzija i hiperglikemija dalje podržavaju razvoj teške glomeruloskleroze koja se dokazuje smanjenjem nivoa glomerularne filtracije i pojavom makroalbuminurije (ekskrecija albumina prelazi 300 mg za 24h) [20]. U preko 50% slučajeva ove promene vode opsežnom gubitku funkcionalno i strukturno zdravih nefrona što može rezultovati bubrežnom insuficijencijom [15].

Mehanizmi nastanka ove nefropatije uključuju poremećaje na nivou kompleksnih intracelularnih procesa koji povezuju multiple metaboličke kao i transmitivne signalne puteve. Tu se podrazumeva direktan uticaj povećane koncentracije glukoze i njenog ulaska u ćeliju na metabolizam poliola [30], poremećaj u aktivnosti intracelularnih metaboličkih puteva [31], aktivacija protein kinaze C [32], nastanak formacija reaktivnih kiseoničnih radikala i razvoj oksidativnog stresa [33], povećana produkcija krajnjih produkata glikacije (AGEs) [34] i poremećena ekspresija brojnih profibrotičnih faktora rasta kao što su TGF-beta [35], CTGF i IGF [36].

Promene koje se javljaju na bubregu mogu se podeliti na rane i kasne. Pod ranim promenama podrazumevamo funkcionalne poremećaje glomerularne filtracije, tubulske reapsorpcije i tubulske sekrecije. Kasne promene uključuju pojavu glomeruloskleroze (difuzne i nodularne), arteronefroskeproze, hroničnog intersticijskog nefritisa, papilarne nekroze i različitih lezija tubula [37].

Aktuelni dijagnostički kriterijumi. Najpouzdanija metoda praćenja razvoja dijabetesne nefropatije je otkrivanje mikroalbuminurije [38]. Mikroalbuminurija je definisana kao koncentracija izlučenih albumina u urinu između 30 – 300 mg u toku 24h. Specifičnost nalaza mikroalbuminurije kao markera rane dijagnostike je tema brojnih diskusija. Često prati i druga patološka stanja, kao što je zapaljenje, arterijska hipertenzija i srčana insuficijencija. Takva stanja posebno su prisutna kod starijih pacijenta koji imaju šećernu bolest. Rana dijagnostika dijabetesne nefropatije je od izuzetne važnosti, s tim pre što se pravovremena terapija ACE-inhibitorima i antagonistima angiotenzin II receptora pokazala uspešnom rezultujući usporenjem napredovanja bolesti ka hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji, kao i smanjenjem mortaliteta [14, 17].

1.2 Tubulointesticijska oboljenja bubrega

Poremećaji funkcije tubula se prema nastanku dele na primarne (urođene) defekte ili sekundarne u sklopu oboljenja bubrega ili drugog patološkog stanja. Sekundarne tubulopatije javljaju se češće nego primarne. Sreću se u tubulointesticiopatijama, glomerulonefritisima sa kliničkom prezentacijom teškog nefrotskog sindroma, sistemskim bolestima vezivnog tkiva, u transplantiranom bubregu u fazi odbacivanja, u amiloidozi, multiplom mijelomu i drugim patološkim stanjima. Sekundatno tubuli mogu biti oštećeni i dejstvom nefrotoksina i nefrotoksičnih lekova [39-41].

Tubulointesticijska oboljenja zahvataju bubrežni intesticijum i okolne tubule. Mogu se javljati u akutnoj i hroničnoj formi, što vodi ka progresivnom razvoju hronične bubrežne insuficijencije. Najčešći uzroci su lokalna (bakterijski pijelonefritis) ili sistemska infektivna stanja,

direktna reakcija bubrežnog tkiva na dejstvo nekih lekova (analgetici, antibiotici), alergijske reakcije (na lekove kao što su penicilin, cefaleksin, nesteroidni anti-inflamatorni lekovi) i drugi poremećaji rada imunološkog sistema, dejstvo toksina (aristolohijske kiseline, ohratoksina A). Simptomi i znaci pre svega zavise od osnovne bolesti koja je dovela do ovog stanja. Uopšteno, prisutna je proteinurija tubularnog tipa (proteini male molekularne mase, za opšte markere tubularnog oštećenja smatra se prisustvo B2M i AMBP proteina u urinu) [39-41].

1.2.1 Endemska nefropatija

Endemska nefropatija (EN) je hronična tubulointesticijalna nefropatija sa podmuklim početkom i sporim razvojem terminalne bubrežne slabosti. Opisana je pedesetih godina dvadesetog veka kao bolest stanovnika aluvijalnih ravnica jugoistočne Evrope, duž reka pritoka Dunava u Bosni i Hercegovini, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumuniji i Srbiji [42].

Incidenca EN-a se sve više pomera ka starijim uzrastnim grupama. Prevalenca bolesti se dugo vremena nije bitnije menjala, da bi u većini žarišta počela da se snižava. Najveći broj obolelih je između 55-59 godina starosti, a gotovo da nisu zabeleženi slučajevi obolelih koji su mlađi od 30 godina. Jasno ispoljena klinička slika se ne zapaža među decom i adolescentima. Poslednjih decenija postoji trend oboljevanja starijih uzrastnih grupa. Ne postoji značajna razlika u oboljevanju među polovima. Rizik od umiranja muškaraca i žena od ove bolesti nije bitno različit [43-45].

Etiologija i patogeneza endemske nefropatije. Pravi uzrok nastanka bolesti je nepoznat iako se ističe značaj nasleđivanja, dejstvo činioca životne sredine kao i prisustvo poremećaja imunog sistema. Porodični karakter oboljenja smatran je jednim od osnovnih dijagnostičkih kriterijuma EN-a. Međutim, podjednake stope oboljevanja pripadnika različitih etičkih grupa u istom žarištu, pojava EN-a među migrantima, jednaka zastupljenost bolesti među članovima domaćinstva povezanih krvnim i bračnim srodstvom, govori u prilog da uloga nasleđa nije od presudnog značaja. Istaživanja su pokazala i mogućnost postojanja specifičnog hromozomskog markera (3q25) kod obolelih i osoba sa visokim rizikom od oboljevanja, ali rezultati nisu potvrđeni na većem broju ispitanika [46].

U ostalim genetskim istraživanjima ističe se značaj postojanja specifičnih aberacija vezanih za X hromozom, razlika u pogledu niza fenotipskih osobina, poremećaj efikasnosti mehanizama oksidativne zaštite, ali bez konačnih zaključaka [42].

Smatra se da odlučujuću ulogu ipak igraju faktori sredine. Uloga protozoa, bakterija, riketija pa čak i virusa isključena je kao mogućnost u nastajanju oboljenja. Posebnu pažnju je, ipak

izazvalo proučavanje uticaja mikotoksina (ohratoksin A) [47-49], *Aristolochia*-e (aristolohijska kiselina 1 i 2) [50], kao i brojnih zagađivača prisutnih u životnoj okolini. Urotelijalni tumori prelaznog epitela su prijavljeni kao česta komplikacija [51-63].

Patološki nalaz. Klasične morfološke promene bubrega u hroničnom stadijumu EN-a podrazumevaju: jako izraženu acelularnu intescijskijsku fibrozu, atrofiju i iščezavanje jednog broja tubula, ćelijsku inflaciju intescijuma različitog stepena intenziteta i različite lokalizacije, očuvane ili kolapsne i fokalno segmentno i globalno sklerozirane glomerule po tipu kolapsne (ishemične, vaskularne) rezidualnosti, čestu udruženost sa tumorima gornjeg urotelijuma (pijelon i ureteri), sklerotične promene na krvnim sudovima, limfostazu i proširenje limfnih sudova, izostanak nekroze papila, bez prisutnih znakova zapaljenja urinarnih puteva. U diferencijalnoj dijagnozi najčešće se pominje hronični glomerulonefritis, analgezična nefropatija, hronični pijelonefritis, vaskularna nefroskleroza, promene u bubrežima izazvane silicijumom i druge promene [64, 65].

Aktuelni dijagnostički kriterijumi. Iako ne postoje specifični kriterijumi za dijagnozu EN-a, sledeće epidemiološke, kliničke, laboratorijske i patomorfološke karakteristike od značaja su u dijagnostici EN-a [51, 66-73]:

- *Epidemiološki podaci:* bolest se javlja u žarištima, endemično kod seoskog stanovništva naselja duž reka Kolubare, Drine, Save, Morave u zemljama bivše Jugoslavije, Istar u Bugarskoj i pritoka Dunava u Rumuniji; ima familijaran karakter, a nije nasledna; zahvata oba pola u približno istoj meri; najranije se bolest ispoljava nakon kraja druge decenije života
- *Klinički i laboratorijski podaci:* neprimetan, podmukao početak, hroničan tok, bez edema i febrilnih faza, arterijski pritisak umereno povišen u oko 40-50% slučajeva obično u odmaklijim fazama bolesti; laboratorijski nalazi govore o primarnom oštećenju tubula – proteinurija je oskudna i tubularnog tipa (β -2-mikroglobulin (B2M), α -1-mikroglobulin (AMBP)); u odmaklijim fazama bolesti postoji jače izražena anemija normohromnog tipa; letalan ishod nastupa tek posle više godina ili i decenija bolesti sa znacima uremije
- *Patološko-anatomske i patološko-histolološke nalazi:* makroskopski – skoro simetrično obostrano smanjivanje bubrega; mikroskopski – tubulske i intescijskijske promene sa manjim ćelijskim imfiltratima prisutne su u intescijumu.

Bolest je, usled nepostojanja markera rane dijagnostike, dijagnostifikovana u stadijumu razvoja hronične bubrežne insuficijencije, gde primenjena terapija nije pokazala značajne rezultate. Istraživanja markera velike specifičnosti i senzitivnosti rane dijagnostike oboljenja su neophodna da bi se bolje razumeo mehanizam nastanka i razvoja EN-a i njegovih posledica, kao i da bi efekat pravovremene terapije bio zadovoljavajući.

1.2.1.1 Aristolohijska kiselina 1 (AA1)

Početak devedesetih godina dvadesetog veka u Belgiji [74], pojavio se veliki broj obolelih žena od rapidnog progresivnog glomerulonefritisa kao posledice konzumiranja tableta za mršavljenje uvezenih iz Kine, zbog čega je i bolest nazvana kineskom biljnom nefropatijom (CHN) [75].

Do ovakvog kobnog trovanja došlo je usled zamene glavnog sastojka, biljke *Stephania tetrandra-e*, biljkom *Aristolochia fangchi*. Otkrivene su specifične lezije tkiva bubrega i urinarnog trakta svih obolelih, kao i promene u naslednom materijalu po tipu AA-DNK adukta, koje su predstavljale neosporni dokaz unosa aristolohijske kiseline u organizam. Bolest se od tada naziva i nefropatijom aristolohijske kiseline (NAA) [76].

Aristolohijska kiselina (AA) kao ekstrakt biljaka iz vrste *Aristolochia* predstavlja smešu strukturno sličnih nitrofenantren-karboksilnih kiselina, gde su 8-metoksi-6-nitro-fenantro-(3,4-d)-1,3-dioksolo-5-karboksilne kiseline (AA1) i 6-nitro-fenantro-(3,4-d)-1,3-dioksolo-5-karboksilne kiseline (AA2) glavne komponente [77]. Ispoljavaju izrazito nefrotoksično i kancerogeno dejstvo [78].

AA se smatra jednim od 2% najpotentnijih poznatih karcinogena kod ljudi. Biljni preparati koji sadrže koren biljaka iz vrste *Aristolochia* klasifikovani su kao kancerogeni grupe I prema internacionalnoj agenciji za istraživanja kancera (IARC). Molekularni mehanizmi oštećenja bubrega pod dejstvom AA, kao i nastanak urotelijalnih tumora, još uvek nisu do kraja razjašnjeni. S obzirom da oštećenje bubrega ne prati uvek pojava tumora i obrnuto, vrlo je verovatno da patološka dejstva AA zavise i od individualne reakcije organizma na koji deluje [77].

Za razliku od ostalih tubulointesticijalnih bolesti, NAA se karakteriše sporom regeneracijom epitela, a često i pojavom tubularne atrofije i intesticijalne fibroze. Usled negativnog dejstva na rast samih ćelija, posledično se javlja usporena regeneracija tubula sa povećanom proliferacijom ne-target ćelija, fibroblasta, i razvojem fibroze. NAA u osnovi predstavlja rapidnu progresivnu intesticijalnu renalnu fibrozu sa atrofijom i gubitkom proksimalnih tubula u superficijalnom korteksu sa progresijom ka dubljim strukturama a relativno očuvanim glomerulima, i brzim razvojem terminalne bubrežne insuficijencije. Inicijalno, početak je gotovo neprimetan, i poremećaj bubrežne funkcije se može utvrditi na osnovu laboratorijskih nalaza. U zavisnosti od veličine bubrežnog oštećenja, može se pojaviti anemija umerenog stepena. U najvećem broju slučajeva sediment urina ne pokazuje specifične promene, a albumin nije prisutan u povećanoj količini. Prisustvo proteina male molekularne mase, kao što su B2M, cistatin C, retinol vezujući protein i AMBP, zabeleženo je kod gotovo svih pacijenata u značajnoj količini. Udružena je sa prisustvom urotelijalnih karcinoma. Veliki broj eksperimentalnih studija na životinjama

pokazale su da intoksikacija AA izaziva promene kod čoveka kao i u tkivu životinja bubrega po tipu bubrežne intersticijalne fibroze i urotelne atipije [79, 80].

Jedan od prvih kliničkih znakova NAA je ekskrecija urinom proteina male molekularne mase, ukazujući na toksično oštećenje ćelija proksimalnih tubula [81]. AA1 inhibira receptor posredovanu endocitozu proteina male molekularne mase na nivou ćelija proksimalnih tubula, posledično nastalu usled smanjene ekspresije gena za megalin. Receptor megalina vezuje transportni neutrofil-želatinaza-udružen lipokalin (LCN2) sa visokim afinitetom, i posreduje u ćelijskom preuzimanju proteina. Poremećaj u endozitozi proteina je dokazan na eksperimentalnim modelima, najverovatnije usled prisustva DNK-adukta u naslednom materijalu [82].

Oksidativni stres je prisutan, a takva reakcija ćelije samo produbljuje dalje oštećenje. Nalaz 8-OHdG u ćelijama koje su duži vremenski period i sa većom dozom izlagane direktnim dejstvom toksina potvrđuje ovu tvrdnju. AA može izazvati formiranje mikronukleusa kao posledicu oštećenja naslednog materijala. Pojava ovih promena je veća, kako se primenjuje veća doza toksina [83].

Mehanizmom nastanka apoptoze možemo objasniti pojavu atrofije epitela u proksimalnim tubulima bubrega kod pacijenata obolelih od NAA. Smatra se da je apoptotični proces indukovano povećanom koncentracijom kalcijuma u ćeliji, preko AA1 uticaja na homeostazu kalcijuma (aktivacija oslobađanja kalcijuma (Ca^{2+}) preko otvaranja kanala i inhibicijom kalcijum ATP-aze, kao posledica i izrok endoplazmatskog i mitohondrijalnog stresa). Povećanje Ca^{2+} može uticati na modulaciju Ca^{2+} zavisnih neutralnih cistein proteaza (kalpana), koje posledično proteolizom kaspaza 3 dovode do razvoja apoptoze. Ali ovaj mehanizam nije do kraja razjašnjen [84, 85].

Alimentarni unos aristolohijske kiseline je svakako najčešći način ulaska toksina u organizam i aktivacija patogenih procesa [86]. Činjenica da se na endemskim područjima javlja i stanovništvo koje nije obolelo od EN-a, ukazuje na multifaktorijalnost i kompleksnost patogenetskih mehanizama oboljenja, što zahteva dalja istraživanja.

1.2.1.2 Ohratoksin A (OTA)

Ohratoksin A (OTA) je mikotoksin različitih vrsta gljivica *Aspergillus*-a i *Penicillium*-a, koje često kolonizuju veliki broj prehrambenih proizvoda, uključujući žitarice, kafu, vino, začine, suvo voće, pivo, sok od grožđa, kao i proizvode životinjskog porekla. Ljudska populacija je time često izložena dejstvu OTA-e. Delom i zbog njegovog dugog poluvremena života u serumu čoveka, skoro 100% od svih ljudskih uzoraka krvi iz nekih geografskih regiona mogu biti pozitivni za OTA. Smatran je potencijalnim izrokom EN-a, što je bio predmet istraživanja

brojnih studija [87, 88]. Njegov uticaj na mehanizam razvoja ove bolesti još uvek je nepoznat, a činjenica da ne postoji strogo univerzalan način reagovanja organizma na prisustvo OTA-e čini dalju analizu pravim izazovom [47, 89, 90]. Međunarodna agencija za istraživanje kancera (IARC), klasifikovala je OTA kao karcinogen 2B klase.

OTA se nakon unosa hranom pasivnim putem resorbuje preko ćelija digestivnog trakta, i na taj način ulazi u sistem vene porte, a preko jetre, gde se delom metaboliše, odlazi u sistemsku cirkulaciju. U plazmi se vezuje za albumin. Preuzimanje OTA-e od strane hepatocita nastaje putem pasivnog transporta, dok tubularne ćelije bubrega poseduju specifični proteinski nosač koji omogućava tubulocitima preuzimanje toksina aktivnim transportom. Rezultati iz nekoliko studija i in vivo i in vitro pokazuju da se OTA delom metaboliše preko P450 citohrom oksidaze i peroksidaza u jetri. Nastaje mala koncentracija hidroksiliranih derivata koji se ne detektuju u urinu [48].

Metaboliti u obliku heksoza i pentoza konjugata prisutni su u velikoj količini u urinu osoba koje su unele OTA toksin u organizam. OTA metaboliti su manje toksičnog dejstva od same OTA-e. Glavni produkti krajnjeg metabolizma OTA-e su: hidroksilirani derivati, i hidroksiohratoksin koje formiraju P450 ili peroksidaza [prostaglandin-H sintaze (PGHS) i / ili lipoksigenaze] prisutne u bubregu. Kako se oni dalje eliminišu iz organizma predmet je daljih istraživanja. Pretpostavka je da iz jetre putem žuči odlaze u digestivni trakt, odakle se dalje, putem fecesa eliminišu iz organizma, a jedan deo je podložan enterohepatičnoj cirkulaciji. Enterohepatična cirkulacija, smanjeno preuzimanje OTA-e od strane ćelija procesom proste difuzije, kao i povećano preuzimanje OTA-e od strane tubulocita specifičnim aktivnim transportom, kao mehanizmi eliminacije nisu efikasni u brzom eliminaciji toksina iz organizma, pa se njegove niske koncentracije mogu naći u krvi u dužem vremenskom periodu nakon unosa toksina. Sa druge strane, nalaz OTA-e u urinu može predstavljati znak akutne izloženosti toksinu. Akumulacija toksina u organizmu doprinosi njegovom toksičnom dejstvu. Smatra se da je dnevni unos manji od 100 ng po kg telesne mase u toku jedne nedelje, bez patoloških posledica po organizam [48].

Regeneracija tkiva i proliferacija ćelija verovatno da igraju ulogu u OTA kancerogenosti. Još uvek nije moguće povezati izloženost pacijenata sa endemskom nefropatijom sa OTA-om i tumorima urinarnog trakta, jer OTA je pronađena u krvi stanovnika drugih zemalja u kojima ne postoji EN. Međutim, OTA indukuje drugačiji proliferativni odgovor ćelija u odnosu na druge renalne karcinogene, koji nije po tipu regenerativne hiperplazije. Hronični unos OTA-e uzrokuje značajno smanjenje težine bubrega, dok je klasična proliferacija praćena povećanjem težine organa [88].

Često se zaključuje da je proliferacija pre odgovor na degenerativne promene, nego direktan odgovor ćelije na prisustvo toksina. Usporena regeneracija posledica je i DNK oštećenja koje posledično, preko aktivacije TP53 gena, usporava normalan ćelijski ciklus. OTA preko poremećaja metabolizma citokina, može direktno da dovede do poremećaja razvojnog ciklusa ćelije i ometanja mitoze. Poremećaj može rezultirati prekidom mitotske deobe i ćelijskoj smrti, ili nenormalnom izlasku ćelije iz mitoze, endoreduplikacijom i produkcijom poliploidnih ćelija. Poliploidne ćelije su genetski nestabilne i vrlo brzo podležu apoptozi. Međutim, smatra se da ponovni ulazak takve ćelije u mitozu može rezultovati nastankom aneuploidnih ćelija i posledičnim razvojem tumora. OTA ne dovodi do nastanka genetskih malformacija po tipu hromozomskih aberacija, poremećaja u razmeni sestrinskih hromatida i stvaranje mikronukleusa [88].

OTA indukuje razvoj fibroze pri hroničnom izlaganju, što se manifestuje pojavom prekomerne ili smanjene ekspresije gena za aktin α -glatkih mišića, E i N kaderine i metaloproteinazu 9. Ovi proteini utiču na metabolizam kolagena i njegov promet u ćeliji. Prisutne su povišene vrednosti kolagena i njegove iRNK u tkivu bubrega. OTA koncentraciju dodatno povećava i smanjenje aktivnosti metaloproteinaze 9, čija sinteza je inhibirana pod dejstvom ovog toksina. Ovaj mehanizam se smatra ključnim za razvoj fibroze prilikom OTA hronične intoksikacije [215, 216].

U patološkom smislu promene u bubrežnom tkivu su opisane kao kortikalna tranzitivna nefropatija udružena sa difuznim fibrotičnim promenama. Kod hronične intoksikacije, osim difuznih fibrotičnih promena, prisutan je i nalaz maligniteta urotelijalnog trakta.

1.2.1 Prerenalno akutno oštećenje bubrega

Akutno oštećenje bubrega (acute kidney injury, AKI) je klinički sindrom koji se karakteriše brzim smanjenjem funkcije bubrega koje prouzrokuje progresivni porast azotnih materija u krvi kod osoba sa predhodno zdravim bubrežima. Obično je praćena oligurijom (diureza manja od 400 ml/24h), kao i znacima poremećene homeostatske i endokrine funkcije bubrega (povećanje ekstraćelijskog volumena tečnosti, hiperkalijemija, metabolička acidoza, smanjena sinteza eritropoetina, aktivne forme vitamina D₃ i drugih supstanci). Na osnovu mesta gde se dešavaju poremećaji koji dovode do AKI, razlikujemo prerenalnu, renalnu i postrenalnu akutnu bubrežnu insuficijenciju [91].

Prerenalna AKI predstavlja brzo smanjenje glomerulske filtracije kao posledice hipoperfuzije bubrega (kod hipovolemijskih stanja, kao što su krvarenja, povraćanja, opekotine, dehidracije, zatim se viđa kod šoknih stanja, kod srčane insuficijencije, kod insuficijencije jetre, kod

sistemskih infekcija, kod poremećaja u metabolizmu proteina i drugo). Glavni poremećaj koji indukuje patološke promene jeste ishemijska reakcija tkiva. U patološkom smislu, prisutna je akutna tubularna nekroza, gde su promene smeštene duž celog nefrona. Bazalna membrana tubula je takođe oštećena. Nekroza tubulocita je praćena povećanim brojem ćelija u mitozu, kao znaka regeneracije [92].

U kliničkoj slici prisutni su simptomi i znaci opšte dehidracije organizma (snižen centralni venski pritisak, suva koža i vidljive sluzokože, oslabljen turgor kože, ortostatska hipotenzija, tahikardija), pacijent gubi na težini, venske pulsacije u uspravnom položaju su odsutne, pacijent se ne znoji i prisutna je opšta slabost i malaksalost organizma. Postoji veliki rizik od razvoja komplikacija od strane kardiovaskularnog sistema po tipu kongestivne srčane insuficijencije, tamponade srca ili razvoja kardiogenog šoka. Laboratorijski nalazi ukazuju na hemo-koncentraciju, povišene vrednosti ureje u urinu, povišena osmolalnost urina i smanjeno izlučivanje natrijuma putem urina [93].

Uprkos značajnim poboljšanjima u terapiji, mortalitet i morbiditet pacijenata sa AKI-jem su i dalje visoki. Glavni razlog za to je nedostatak ranih dijagnostičkih markera oboljenja, što za posledicu ima odlaganje pravovremene terapije i smanjenje njene efikasnosti.

Funkcionalna genomika i proteomika humanih i životinjskih modela AKI omogućile su otkrivanje i definisanje novih biomarkera rane dijagnostike i potencijalnih terapijskih meta. Najčešće su otkriveni potencijalni markeri u plazmi (neutrofilna želatinaza, lipokalin i cistatin C) i u urinu (neutrofilna želatinaza, lipokalin, marker bubrežnog oštećenja 1, interleukin 18, cistatin C, AMBP, fetuin i mepirin). Ovim ispitivanjima moguće je i istražiti etiološku diferencijaciju oboljenja, kao i ispitivati parametre kojima bi se predvideo dalji klinički tok i ishod oboljenja [94]. Dalja istraživanja omogućiće pronalaženje odgovora na brojna postavljena pitanja vezana za patofiziološki aspekt AKI-e i olakšati dosadašnji terapijski pristupi [95].

1.3 Proteomska istraživanja u nefrologiji

Proteomika je sistemska studija jednog proteoma koji predstavlja ukupni sadržaj belančevina jedne ćelije, organizma ili telesnih tečnosti (krv, urin, znoj, i drugo). Dok se genom jednog organizma smatra statičkom komponentom, proteom pokazuje dinamička svojstva, gde se proteinski profili menjaju u zavisnosti od prisustva brojnih ekstra i intracelularnih stimulusa. Primena proteomske tehnologije omogućila bi detaljniju analizu funkcije ispitivanih proteina i njihov značaj u brojnim fiziološkim stanjima, u bolesti, kao i tokom primene adekvatne terapije, a jednako je efikasna u istraživanju i radu na modelima kulture ćelija, kao i na humanom

materijalu sakupljenom od samih pacijenata. Klinička proteomika je primena proteomskih analiza u otkrivanju dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera, praćenju stanja bolesnika i efikasnosti primenjenih terapijskih protokola i razumevanju mehanizama nastanka, razvoja i progresije oboljenja. Smatra se jednim od vodećih oblasti istraživanja današnjice [96-98].

Mokraća je važan materijal za naučno-istraživački rad kao indirektni pokazatelj ispravnosti bubrežne funkcije. Upotreba proteomskih tehnologija pri analizi belančevina u mokraći pacijenata i zdravih ispitanika donela bi nova saznanja koja bi doprinela potpunijem razumevanju nastanka i razvoja bolesti sa ciljem da se identifikuju potencijalni prognostički/dijagnostički markeri oboljenja i njihovom daljom primenom u kliničkoj praksi.

Kreiranje eksperimentalnog modela ispitivanja efekata toksičnosti aristolohijske kiseline i ohratoksina A na humanim tubulocitima u toku akutnog i hroničnog kontinuiranog izlaganja ćelija adekvatnom koncentracijom ovih toksina, doprinelo bi boljem razumevanju patofizioloških mehanizama nastanka bolesti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Radna hipoteza. Kod pacijenata sa bubrežnim oboljenjima kao što su Balkanska endemska nefropatija (EN), dijabetesna nefropatija (DN) i akutna prerenalna bubrežna insuficijencija (AKI), za razliku od grupa zdravih dobrovoljaca koji žive u endemskim (HEN) i ne-endemskim područjima (HGER), očekuju se značajne razlike u vrsti belančevina koje su mokraćom uklonjene iz organizma, što bi ukazivalo na specifične promene regulacije metabolizma belančevina u patogenezi ispitivanih oboljenja. U kulturi humanih tubulocita izloženih efektima aristolohijske kiseline i ohratoksina A, za razliku od netretiranih ćelija, očekuju se značajne razlike u broju i vrsti belančevina, što bi ukazivalo na specifične promene regulacije metabolizma belančevina pod dejstvom ovih toksina, kao potencijanih etioloških faktora nastanka endemske nefropatije.

Ciljevi rada su:

- Istraživanje proteina u urinu pacijenata sa endemskom nefropatijom i zdrave populacije koja živi na područjima endemske nefropatije
- Istraživanje proteina u urinu pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom
- Istraživanje proteina u urinu pacijenata sa akutnom prerenalnom bubrežnom insuficijencijom
- Istraživanje proteina u urinu zdravih dobrovoljaca iz ne-endemskih područja
- Upoređivanje dobijenih rezultata analize urina sa određivanjem uzroka i patofizioloških mehanizama endemske nefropatije
- Ispitivanje potencijane uloge identifikovanih proteina kao prognostičkih ili dijagnostičkih markera endemske nefropatije
- Ispitivanje efekata aristolohijske kiseline na humane tubulocite (HK2 ćelije) pri akutnom i hroničnom izlaganju
- Ispitivanje efekata ohratoksina A na humane tubulocite (HK2 ćelije) pri akutnom i hroničnom izlaganju
- Ispitivanje efekata aristolohijske kiseline i ohratoksina A na humane tubulocite (HK2 ćelije) pri akutnom i hroničnom izlaganju ćelija toksinima
- Ispitivanje postojanja identifikovanih specifičnih belančevina u akutnom i hroničnom modelu ćelijske intoksikacije aristolohijskom kiselinom i/ili ohratoksinom A na patohistološkim preparatima tkivu bubrega EN pacijenata sa tumotima urotelijuma.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Pacijenti

U ispitivanje je uključeno 360 osoba podeljenih u šest grupa:

- I grupa – 60 zdravih ispitanika koji žive na područjima endemske nefropatije (Kutleš, okolina Leskovca)
- II grupa – 60 pacijenata sa endemskom nefropatijom (EN), sa niskim vrednostima proteina u mokraći (ispod 150 mg/L), dijagnostikovanih na Institutu za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu, Srbija
- III grupa – 60 pacijenata sa EN, sa visokim vrednostima proteina u mokraći (iznad 150 mg/L), dijagnostikovanih na Institutu za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu, Srbija
- IV grupa – 60 pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom, dijagnostikovanih na Odeljenju za nefrologiju i reumatologiju Univerzitetskog medicinskog centra Georg-August Univerziteta u Getingenu, u Nemačkoj
- V grupa – 60 pacijenata sa akutnim oštećenjem bubrega (AKI), dijagnostikovanih na Odeljenju za nefrologiju i reumatologiju Univerzitetskog medicinskog centra Georg-August univerziteta u Getingenu, u Nemačkoj
- VI grupa – 60 zdravih ispitanika koji ne žive na područjima endemske nefropatije

Kontrolne grupe su obuhvatale zdrave dobrovoljce oba pola i istih godina kao i ispitivani bolesnici. Analizirani su pacijenti sa kompletnom dokumentacijom. Godine i pol pacijenata, dijagnoza oboljenja, laboratorijski nalazi, dobijeni su iz kompjuterski registrovanih podataka. Prilikom odabira ispitanika, korišćeni su sledeći kriterijumi: starost ispitanika između 30-85 godina i ispitanici bez akutne manifestacije bolesti. Da bi se postigla uniformna klasifikacija pacijenata i izbegao uticaj razlike u dijagnostičkim kriterijumima između ova dva klinička centra, korišćeni su dijagnostički kriterijumi nacionalne bubrežne fondacije (National Kidney Foundation - the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI)). Endemska nefropatija je dijagnostikovana na Institutu za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu, Srbija na osnovu sledećih kriterijuma [66]: osobe koje naseljavaju endemska područja, anamnestički podatak o postojanju obolelih od EN u porodici, nalaz proteina sa malom molekularnom masom u mokraći (povećana urinarna ekskrecija beta-2-mikroglobulina (B2M) i/ili alfa-1-mikroglobulina

(AMBP)), blaga proteinurija (vrednosti manje od 1g proteina za 24h), poremećena bubrežna funkcija, anemija i isključivanje postojanja bilo kojeg drugog poznatog bubrežnog oboljenja. Pacijenti sa akutnim oštećenjem bubrega i sa dijabetesnom nefropatijom dijagnostikovani su na Odeljenju za nefrologiju i reumatologiju Univerzitetskog medicinskog centra Georg-August Univerziteta u Gotingenu, u Nemačkoj. Pacijenti sa neoplastičnim promenama, postojanjem infekcije mokraćnih puteva tokom predhodna dva meseca, sa prisustvom hronične sistemske infekcije (HIV, HBV, HCV), zdravi dobrovoljci koji su u srodstvu sa EN pacijentima, kao i trudnice isključeni su iz daljeg ispitivanja.

Proteomska analiza urina ispitanika odobrena je odlukom Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Nišu i lokalnog etičkog komiteta univerzitetske bolnice, Georg-August univerziteta u Gotingenu, u Nemačkoj.

3.2 Kultura humanih ćelija epitela proksimalnih tubula bubrega (HK2 ćelijska kultura)

Proteomska analiza humanih tubularnih ćelija (ćelije epitela proksimalnih tubula bubrega, HK2 ćelijski tip, gotov soj, sekundarna kultura ćelija) pri izlaganju toksinima (aristolohijska kiselina 1, ohratoksin A) vršena je na materijalu dobijenom iz četiri različite eksperimentalne grupe:

- I grupa – HK2 ćelije izlagane toksičnim efektima aristolohijske kiseline 1 (AA1)
- II grupa – HK2 ćelije izlagane toksičnim efektima ohratoksina A (OTA)
- III grupa – HK2 ćelije izlagane efektima AA1 i OTA
- IV grupa – HK2 ćelije bez tretmana

Kontrolnu grupu činile su HK2 ćelije koje nisu izlagane efektima toksina. Ćelije su izlagane dejstvu toksina u toku akutnog (72h) i hroničnog eksperimenta (1 mesec, 2 meseca). Doziranje toksina u toku eksperimenta zavisilo je od rezultata testa vijabilnosti (MTT).

Kontrolnu grupu u ispitivanju nivoa parametara oksidativnog stresa, činile su HK2 ćelije tretirane vodonik peroksidom u toku 72h po predhodno uspostavljenom protokolu [99]. Ćelije su uzgajane kao monosloj u medijumu Quantum 286 za epitelne ćelije (PAA) sa 1% rastvorom Penicilina-Streptomicina (Gibco) bez prisustva seruma (FCS-free medijum), koristeći 75 cm² posude za rad sa ćelijskom kulturom (Falcon) na temperaturi od 37⁰C u 5% CO₂-95% vazdušnom okruženju. Kontrolnu grupu prilikom ispitivanja nivoa markera fibroze činila je sekundarna kultura humanih fibroblasta dobijenih iz zdravih bubrega (TK 173).

3.3 Sakupljanje uzoraka urina

Sakupljanje uzoraka urina izvršeno je prema preporukama EuroKup/HKUPP protokola (<http://www.eurokup.org/>). Za potrebe proteomskih istraživanja sakupljani su uzorci drugog jutarnjeg urina. Odmah nakon kolektiranja, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 1.000xg i 4⁰C da bi se uklonio talog ćelija iz mokraće. Supernatant je izdvojen od taloga, alikvotiran (10 mL po alikvotu) i skladišten na -80⁰C do izvršenja analiza.

Za dodatna laboratorijska istraživanja, od svakog uzorka mokraće izdvojeno je 10 mL. Svi laboratorijski parametri, uključujući merenja koncentracije proteina i albumina u mokraći, mereni su standardnim biohemijskim metodama u laboratoriji za rutinsku dijagnostiku odeljenja za nefrologiju i reumatologiju Univerzitetskog medicinskog centra Georg-August univerziteta u Göttingenu, u Nemačkoj.

3.4 Precipitacija proteina i određivanje koncentracije

Iz svake eksperimentalne grupe izdvojeno je slučajnim izborom 10 različitih uzoraka mokraće. Na osnovu vrednosti koncentracije proteina dobijene rutinskim laboratorijskim analizama, iz svakog izabranog uzorka mokraće izdvojene su adekvatne zapremine (ona zapremina koja sadrži 200 µg proteina), od kojih je načinjen grupni uzorak (u jednom grupnom uzorku bilo je 2 mg proteina). Grupni uzorak je koncentrisan upotrebom 5 kDa spin kolona Vivaspin 20 (Sartorius, Nemačka). Od ostalih uzoraka urina formirana su dodatna četiri grupna uzorka za potrebe daljih ispitivanja.

Da bi se smanjila količina soli u koncentrisanim uzorcima, kao i da bi se postigla izolacija proteina, korišćena je hloroform-metanol precipitaciona metoda po Wessel-u i Flugge-u [100]. Precipitirani proteini su nakon toga ponovo rastvoreni u adekvatnim količinama lizirajućeg pufera (ureja 9,5 M, CHAPS 2%, 2% amfolita, 1% DTT) za potrebe 2D gel elektroforeze. Ukupna koncentracija proteina u puferu određivana je upotrebom proteinskog eseja (Bio-Rad, Hercules, USA) prema Bradfordu [101]. Bovin serum albumin (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka) je korišćen kao standard.

3.5 Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE)

Prva dimenzija separacije belančevina u 2D elektroforezi podrazumeva razdvajanje belančevina na osnovu njihovih izoelektričnih tačaka (izoelektrično fokusiranje, IEF) (prolazeći kroz postavljeni pH gradijent na IPG trakama uz pomoć električne struje proteini se raspoređuju

unutar traka). Druga dimezija podrazumeva razdvajanje belančevina na osnovu njihovih molekularnih masa i brzine kretanja kroz električno polje. 2-DE uzoraka izvršena je prema adaptiranom protokolu [102] uz korišćenje 11 cm pI 4-7 IPG traka (Bio-Rad, Hercules, USA). IPG trake su pasivno rehidrirane u toku 12h pomoću 185 µL rehidratacionog pufera koji sadrži 150 µg proteina ispitivanih uzoraka (8 M ureja, 1% CHAPS, 1% DTT, 0,2% amfolita pI 4-7, plavi brom fenol u tragu). IEF je izvršeno pomoću PROTEIN(R) IEF ćelije (Bio-Rad, Hercules, USA). Temperatura je podešena na 20⁰C i fokusiranje izvedeno po sledećem programu: 500 V (1h), 1.000 V (1h), 2.000 V (1h) i 8.000 (50.000 Včasova). Nakon toga, da bi se redukovale disulfidne veze u fokusiranim proteinima, IPG trake su tretirane 20 minuta SDS ekvibracionim puferom (6M ureja, 30% glicerol, 2% SDS, 0,05 M Tris-HCl pH 8,5 i 2% DTT) na šejkeru. Trake su nakon toga alkilisane 20 minuta rastvorom 2.5% jodacetamida i 0,25% brom fenol plavog. Za razdvajanje proteina na osnovu njihove molekularne mase, korišćeni su SDS-PAGE, 12% BisTris Criterion precast gelovi (Bio-Rad, Hercules, USA) po protokolu proizvođača.

3.6 Bojenje gelova

Nakon razdvajanja proteina, 2-DE gelovi su fiksirani u 50% metanolu i 12% sirćetnoj kiselini preko noći, i 5h tretirani rastvorom Flamingo koji sadrži fluorescentne gel boje (Bio-Rad, Hercules, USA). Nakon bojenja, gelovi su skenirani upotrebom FLA-5100 skenera (Fuji Photo, Kahagawa, Japan) u 50 µm rezoluciji, a slike analizirane u Delta 2D 3.4 software-u (Decodon, Grefswald, Nemačka). Za identifikaciju proteinskih tačaka na gelu, nakon skeniranja, gelovi su obojeni koloidnom Coomassie plavom bojom (Roth, Karlsruhe, Nemačka) preko noći.

3.7 Dvodimenzionalna diferencijalna in-gel elektroforeza (2D-DIGE)

Da bi se izbegla razlika u interpretaciji rezultata na osnovu razlike u eksperimentalnim uslovima prilikom izvodjenja 2-DE, kao i da bi se potvrdili rezultati i statistički obradile razlike u proteinskoj ekspresiji, izveli smo 2D-DIGE. Proteini iz grupnih uzoraka urina precipitirani su hloroform-metanol metodom.

Rezultujući talog je rastvoren u marker-puferu (30 mM Tris-HCl pH 8,5, 9,5 M urea, 2% CHAPS), a nakon 30 minuta, rastvor je centrifugiran (5 minuta na 13.000 x g i 4⁰C). Koncentracija proteina određivana je na gore opisan način. Obeležavanje proteina i DIGE izvedeni su po adaptiranom protokolu [103]. 2-DE je izvedena na gore opisan način sa upotrebom 11 cm pI 4-7 IPG traka (Bio-Rad, Hercules, USA). CyDye obeleženi proteinski gelovi skenirani su upotrebom 50 µm rezolucije na FLA-5100 skeneru sa ekscitacijom lasera na 473 nm i filterom

510LP (Cy2), sa ekscitacijom lasera na 532 nm i filterom 575LP (Cy3), kao i sa ekscitacijom lasera na 635 nm i filterom 665LP (Cy5). Skenirane slike su formirane u 16-bitnom TIFF formatu. Upoređivanje proteinskih mapa, sa identifikacijom zajedničkih tačaka, kao i statističkom obradom (upotreba Studentovog t testa, gde je signifikantna razlika utvrđena za p vrednost manju od 0.01) rađeno je upotrebom Delta 2D software-a (Decodon, Greifswald, Nemačka). Za identifikaciju proteinskih tačaka na gelu, nakon skeniranja, gelovi su obojeni koloidnom Coomassie plavom bojom (Roth, Karlsruhe, Nemačka) preko noći.

3.8 In-gel digestija i mass spektrometrijska analiza

Nakon odabira proteinskih tačaka na ispitivanim gelovima, pažljivo je izvršena ekstrakcija i digestija rastvorom tripsina. Dobijena smeša peptida se meša sa kristaloidnim matriksom na eksperimentalnoj ploči. Identifikacija peptidnog spektra vršice se pomoću mass spektrometra (MALDI-TOF i MALDI-TOF-TOF-MS). Proteini su identifikovani na osnovu podudarnosti u najmanje dve peptidne sekvence pomoću online baze podataka (Swiss-Prot primarna sekvenca baza podataka ograničena na *Homo sapiens* taksonomiju) koristeći MASCOT PMF software 2.2 (Matrix Science) [104-106]. Karboksimetilacija Cys rezidua je izabrana kao fiksna modifikacija, dok je oksidacija Met rezidua izabrana kao varijabilna modifikacija u sistemu pretrage. Minimalni kriterijum za pozitivnu identifikaciju proteina predstavljao je najmanje 20% identifikovane sekvence peptidnog lanca.

3.9 Western blot analiza

Da bi se potvrdili rezultati dobijeni 2D-DIGE analizom, korišćena je Western blot analiza prema standardnom protokolu [107]. Iz svake eksperimentalne grupe izdvojeno je 20 uzoraka mokraće za dalju analizu. Uzorci su hloroform-metanol precipitirani na predhodno opisan način. Koncentracija proteina određivana je Bradford esejom. Adekvatna količina uzoraka (ekvivalent sadrži 100 µg proteina) korišćena je tokom blot analize. Inkubacija membrana sa primarnim antitelom nakon blotiranja izvršena je na 4⁰C u toku 8h (preko noći). Kao primarna antitela korišćena su: zečja poliklonalna anti-POT1 antitela protiv protektora telomera 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), mišja monoklonalna anti-LMAN2 antitela protiv manoza-vezujućeg lektina (Abcam, U.K.), mišja monoklonalna anti-APOH antitela protiv beta-2-glikoproteina I (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), zečja poliklonalna anti-SOD1 antitela protiv superoksid dizmutaze 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), zečja poliklonalna anti-AMBP antitela protiv alfa-1-mikroglobulina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) i zečja poliklonalna anti-B2M antitela protiv

beta-2-mikroglobulina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Inkubacija membrana 1h na sobnoj temperaturi (18⁰C) izvršena je upotrebom odgovarajućih sekundarnih antitela: Alexa Fluor 647 kozja anti-mišja IgG antitela ili Alexa Fluor 647 kozja anti-zečja IgG antitela. Nakon toga, višak sekundarnog antitela je uklonjen ispiranjem pomoću standardnih pufera (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7,4) tri puta to 10 minuta. Membrane su nakon toga osušene i skenirane pomoću FLA-5100 skenera (Fuji Photo, Kanagawa, Japan) sa upotrebom 635 nm emisije laserskog zraka. Digitalizovane slike su produkovane u 50 µm rezoluciji, a obrađene i dalje analizirane u Image J software-u (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.10 Dot blot analiza

Da bi se ispitala dijagnostička vrednost identifikovanih proteina na velikom populacionom uzorku primenjena je dot blot analiza uzoraka urina [108]. Adekvatna količina uzorka (volumen urina koji zadrži 10 µg proteina) nanescena je na nitroceluloznu membranu za blotiranje. Svaki uzorak je nanesen u triplikatu. Nakon sušenja membrana je tretirana rastvorom 5% suvog mleka u standardnom puferu (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) u toku 1h na sobnoj temperaturi (18⁰C). Nakon toga, membrane su isprane tri puta po 10 minuta standardnim puferom, i inkubirane sa rastvorima primarnih antitela u standardnom puferu, u koncentraciji koja je preporučena protokolom proizvođača. Kao primarna antitela korišćena su: zečja poliklonalna anti-POT1 antitela protiv protektora telomera 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), mišja monoklonalna anti-LMAN2 antitela protiv manozna-vezujućeg lektina (Abcam, U.K.), mišja monoklonalna anti-APOH antitela protiv beta-2-glikoproteina I (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), zečja poliklonalna anti-SOD1 antitela protiv superoksid dizmutaze 1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), zečja poliklonalna anti-AMBP antitela protiv alfa-1-mikroglobulina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) i zečja poliklonalna anti-B2M antitela protiv beta-2-mikroglobulina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Inkubacija membrana 1h na sobnoj temperaturi (18⁰C) izvršena je upotrebom odgovarajućih sekundarnih antitela: Alexa Fluor 647 kozja anti-mišja IgG antitela ili Alexa Fluor 647 kozja anti-zečja IgG antitela. Nakon toga, višak sekundarnog antitela je uklonjen ispiranjem pomoću standardnih pufera (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) tri puta po 10 minuta. Membrane su nakon toga osušene i skenirane pomoću FLA-5100 skenera (Fuji Photo, Kanagawa, Japan) sa upotrebom laserskog zraka talasne dužine 635 nm. Digitalizovane slike su produkovane u 50 µm rezoluciji, a obrađene i dalje analizirane u Image J software-u (NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.11 Test vijabilnosti ćelija (MTT test)

Ćelijska vijabilnost je testirana upotrebom ćelijskog proliferacionog kita (Proliferation Kit I (MTT)) kolorimetrijskog eseja za ne-radioaktivnu kvantifikaciju vijabilnosti ćelijske proliferacije (Roche Applied Bioscience, Mannheim, Nemačka). Ćelije su kultivisane u 200 μ L medijuma pri koncentraciji od 5×10^3 ćelija po odeljku u 96-tnoj mikrotitracionoj posudi (tissue culture grade, Falcon), a MTT test je izveden upotrebom protokola proizvođača. GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) korišćen je za statističku analizu podataka. Upoređivanje vrednosti dve grupe izvršeno je korišćenjem t-testa. One-way ANOVA test korišćen je u upoređivanju vrednosti kod multiplih grupa, a statistička značajnost je postavljena za p vrednosti veće od 0,05. MTT je ponovljen tri puta za svaki postavljeni eksperiment. Date vrednosti su predstavljene srednjom vrednošću i standardnom devijacijom u poređenju sa ćelijama koje nisu podvrgavane tretmanom (kontrola).

3.12 Imunofluorescentna bojenja ćelija

U inkubacionoj posudi (16 pregrada, 200 μ L zapremine svaka) potrebno je postaviti $1-3 \times 10^5$ predhodno tretiranih ćelija, i inkubirati u medijumu bez prisustva seruma (karakteristike medijuma opisane su u predhodnim odeljcima). Nakon 24h-ovne inkubacije, ćelije su tretirane 3 x 5 minuta PBS rastvorom na sobnoj temperaturi, a zatim fiksirane u 4% rastvoru paraformalaldehida u PBS-u (200 μ L rastvora po odeljku). Nakon 30 minuta, ponovo su isprane 3 x 5 minuta PBS-om. Za potrebe ispitivanja lokalizacije i distribucije proteina unutar ćelija, permeabilizacija je izvršena 30" tretmanom 0,1% rastvorom Triton X-100 u PBS-u. Za potrebe ispitivanja proteina koji se izlučuju ekstracelularno, nije rađena permeabilizacija. Nakon toga, ćelije su isprane 3 x 5 minuta PBS-om, i inkubirane 1h u blokirajućem puferu (5% rastvor kozjeg seruma u 1% BSA) na sobnoj temperaturi.

Korišćena su sledeća primarna antitela (Abcam, UK): Eef1A1 (antizečje antitelo), Ndfus1 (antimišje antitelo), Lamin-A/C (antizečje antitelo), Ube2N (antizečje antitelo), ORP 150 (antimišje antitelo), Eif5A (antizečje antitelo), kao i antitela (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) protiv fibronektina i aktina alfa glatkih mišića (antizečja antitela) [99]. Ćelije su inkubirane rastvorima primarnih antitela u blokirajućem puferu na temperaturi od 4°C u toku 12h, 3x5 minuta isprane PBS-om i 1h inkubirane 1h na sobnoj temperaturi rastvorima odgovarajućih sekundarnih antitela u blokirajućem puferu (Alexa Fluor obeležena sekundarna kozja antizečja i antimišja antitela, Molecular probes, UK). Ćelije su isprane 3x10 minuta PBS-om, uklonjen je sabirni deo posuda, a staklena pločica sa ćelijama prekrivena je rastvorom DAPI-a i sahatnim stakalcem. Uzorci su nakon toga analizirani upotrebom imunofluorescentne mikroskopije (Carl Zeiss Axiovert S100TV).

3.13 Histološki preparati tkiva tumora bubrega pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovane endemske nefropatije

Sakupljeni su patohistološki uzorci bubrežnog tkiva 20 pacijenata sa tumorom gornjeg urotelijuma sa Instituta za Patologiju kliničkog centra u Nišu, podeljeni u dve eksperimentalne grupe:

- Pacijenti sa EN
- Pacijenti bez prisustva EN-a

Fiksacija tkivnih uzoraka obavljena je u 10% rastvoru formaldehida za 24 časa [109]. Tkivo je rutinski obrađivano, kalupljeno u parafinu i sečeno na mikrotomu, debljine 4 μ m.

3.14 Imunohistologija preparata tkiva

Nakon deparafinacije i procesiranja u graduisanim alkoholima na odabranim isečcima primenjena je imunohistološka metoda bojenja prema standardizovanom protokolu [109]. Korišćena su sledeća primarna antitela (Abcam, UK): Eef1A1 (antizečje antitelo), Ndfus1 (antimišje antitelo), Lamin-A/C (antizečje antitelo), Ube2N (antizečje antitelo), ORP 150 (antimišje antitelo), Eif5A (antizečje antitelo), kao i antitela (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) protiv fibronektina i aktina alfa glatkih mišića (antizečja antitela).

Alexa Fluor obeležena kozja antizečja i antimišja antitela, (Molecular probes, UK) korišćena su kao sekundarna antitela. DAPI je korišćen za vizualizaciju nuklearnih struktura.

Pločice su posmatrane pod imunofluorescentnim mikroskopom i 20x uvećanjem (Carl Zeiss Axiovert S100TV).

3.15 Statistička analiza podataka

Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem GraphPrism softverskog paketa, verzija 4. Deskriptivna statistika je prikazana srednjim vrednostima i standardnom devijacijom za kontinuirane podatke.

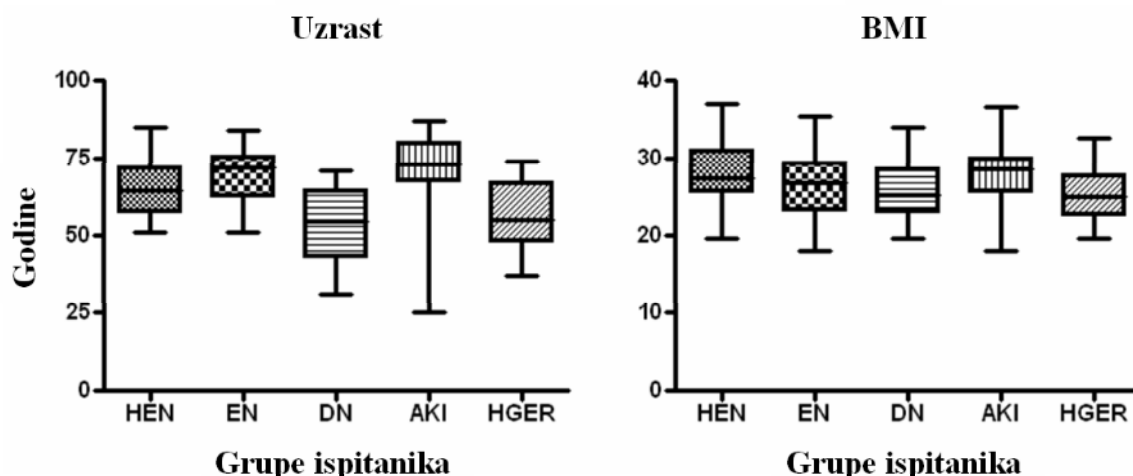
Za upoređivanje varijabli iz pet eksperimentalnih grupa korišćena je one-way analiza varijanse (ANOVA, Kruskal-Wallis test). Vrednost $p < 0,05$ smatrana je za statistički značajnu.

Klinička primenljivost ispitivanih parametara analizirana je ROC krivom. ROC krive su konstruisane i površina ispod krive (AUC), standardna greška, 95% konfidentni interval, senzitivnost i specifičnost izračunati su korišćenjem GraphPrism softverskog paketa, verzija 4. Graniczne vrednosti, koje diskriminiraju slučajeve sa pozitivnom i negativnom dijagnozom, jasno su postavljene.

4. REZULTATI

4.1 Pacijenti

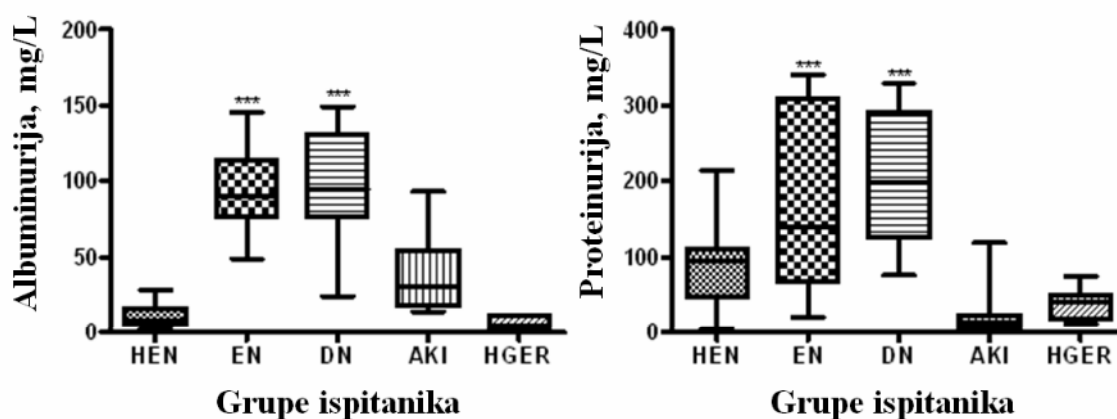
Zdravi dobrovoljci iz EN regiona (n=60), EN pacijenti (n=120), pacijenti sa prerenalnom AKI (n=60), pacijenti sa DN (n=60) i zdravi dobrovoljci iz neendemskih područja (n=60) uključeni su u ova ispitivanja. Bilo je ukupno 207 (57,50%) muškaraca i 153 (42,50%) žena, starosti 64 ± 13 godina. Nije postojala statistički značajna razlika u vrednostima indeksa telesne mase (body mass index, BMI) i srednjih godina između ispitanika različitih grupa (**Grafikon 1**).



Grafikon 1. Starosna distribucija i distribucija indeksa telesne mase (BMI) među ispitanicima: ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa: HEN – zdravi ispitanici koji žive u regionima endemske nefropatije; EN – pacijenti sa endemskom nefropatijom; DN – pacijenti sa dijabetesnom nefropatijom; AKI – pacijenti sa prerenalnom akutnom bubrežnom insuficijencijom; HGER – zdravi ispitanici koji žive u ne-endemskim regionima

4.2 Određivanje koncentracije proteina u urinu korišćenjem rutinskih laboratorijskih metoda

Ukupni proteini u urinu i koncentracija albumina u sakupljenim uzorcima urina kvantifikovani su rutinskim laboratorijskim analizama (**Grafikon 2**).



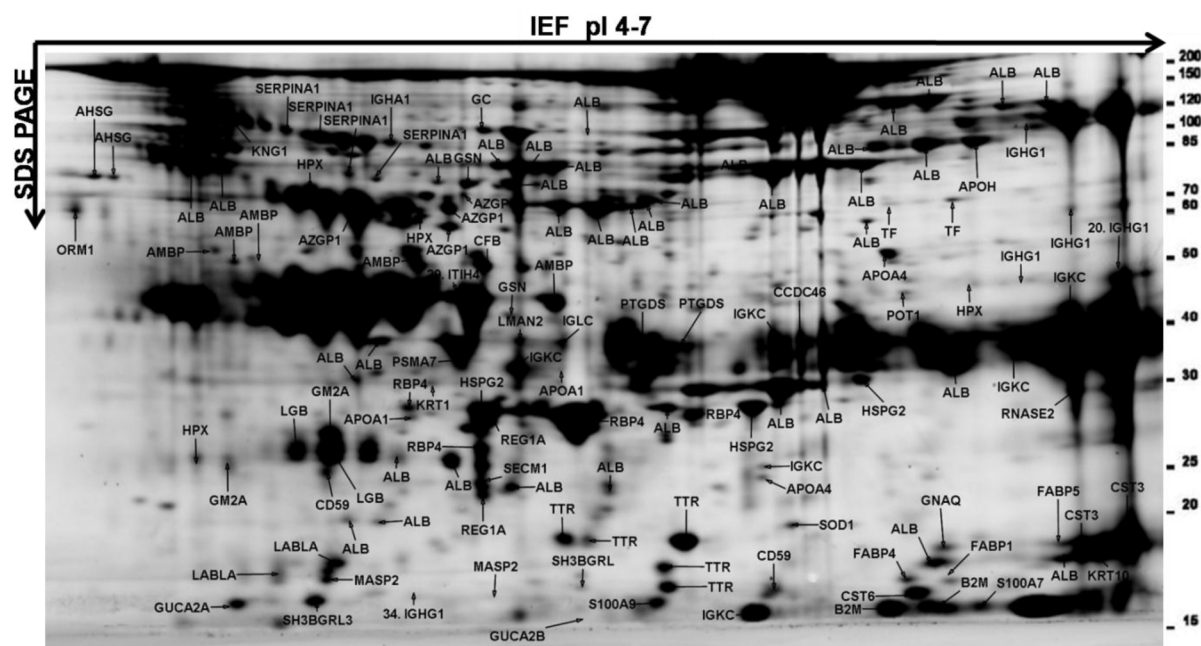
Grafikon 2. Rutinske laboratorijske analize: proteinurija i albuminurija: HEN – zdravi ispitanici koji žive u regionima endemske nefropatije; EN – pacijenti sa endemskom nefropatijom; DN – pacijenti sa dijabetesnom nefropatijom; AKI – pacijenti sa prerenalnom akutnom bubrežnom insuficijencijom; HGER – zdravi ispitanici koji žive u ne-endemskim regionima; koncentracija proteina i albumina u urinu je značajno veća u uzorcima EN i DN pacijenata

Na osnovu vrednosti proteinurije, uzorci urina EN pacijenata podeljeni su u dve eksperimentalne grupe za dalje 2-DE analize: pacijenti sa niskim (proteinurija je manja od 150 mg/L, EN L) i visokim vrednostima proteinurije (proteinurija je veća od 150 mg/L, EN H).

4.3 Mapiranje EN i HEN urinarnog proteoma

Da bi kreirali mape proteoma ispitivanih uzoraka, prezipitali smo proteine zbirnih uzoraka i izveli 2-DE analizu na gore opisani način. Ispitivanjem mapa pet zbirnih uzoraka po grupi zaključujemo da su proteinski profili zbirnih uzoraka ispitivanih grupa su bili visoko reproduibilni bez značajnih razlika unutar same grupe. Nakon kreiranja mapa, gelovi su obojeni plavim Coomassie da bi se nastavilo sa daljim procesom identifikacije. Delta 2D analiza digitalnih slika gelova je pokazala postojanje 417 ± 12 i 481 ± 34 različitih proteinskih tačaka u 4-7 pI rangu 2D gel regiona zbirnih uzoraka urina pacijenata EN L i EN H respektivno, a samo 369 ± 11 proteinskih tačaka u 4-7 pI rangu 2D gel regiona zbirnih uzoraka urina HEN. Dodatno, analizirane su i proteinske mape zbirnih uzoraka ostalih eksperimentalnih grupa – EN, AKI i HGER. Delovi gelova sa određenim proteinskim tačkama uklonjeni su i analizirani preko triptične in-gel digestije. Za pouzdanu identifikaciju proteina koristili smo MALDI-TOF/TOF-MS/MS i Mascot pretragu podataka [104].

Identifikovali smo ukupno 213 proteina koji odgovaraju zbirci od 61 ne-reduntantnog proteina (**Slika 1, Tabela 1**).



Slika 1. Dvodimenzionalna diferencijalna in-gel elektroforeza (2D-DIGE) – digitalna slika urinarnog proteoma EN pacijenata: 213 identifikovanih proteina odgovara listi od 61 različitog ne-reduntantnog proteina (svaki identifikovan protein predstavljen je svoj genetičkim imenom i markiran na gel mapi). Proteini su razdvojeni preko 4-7 pI ranga korišćenjem IEF i 12% SDS PAGE (usled njihove očekivane molekularne težine)

Tabela 1. Lista identifikovanih proteina u urinu analiziranih grupnih uzoraka korišćenjem masene spektrometrije i Mascot pretrage podataka; ulazni kodovi za Swiss-Prot i NCBI baze podataka su prikazani. Informacije o peptidnom masenom fingerprintu (PMF) i MS/MS podaci su takođe prikazani.

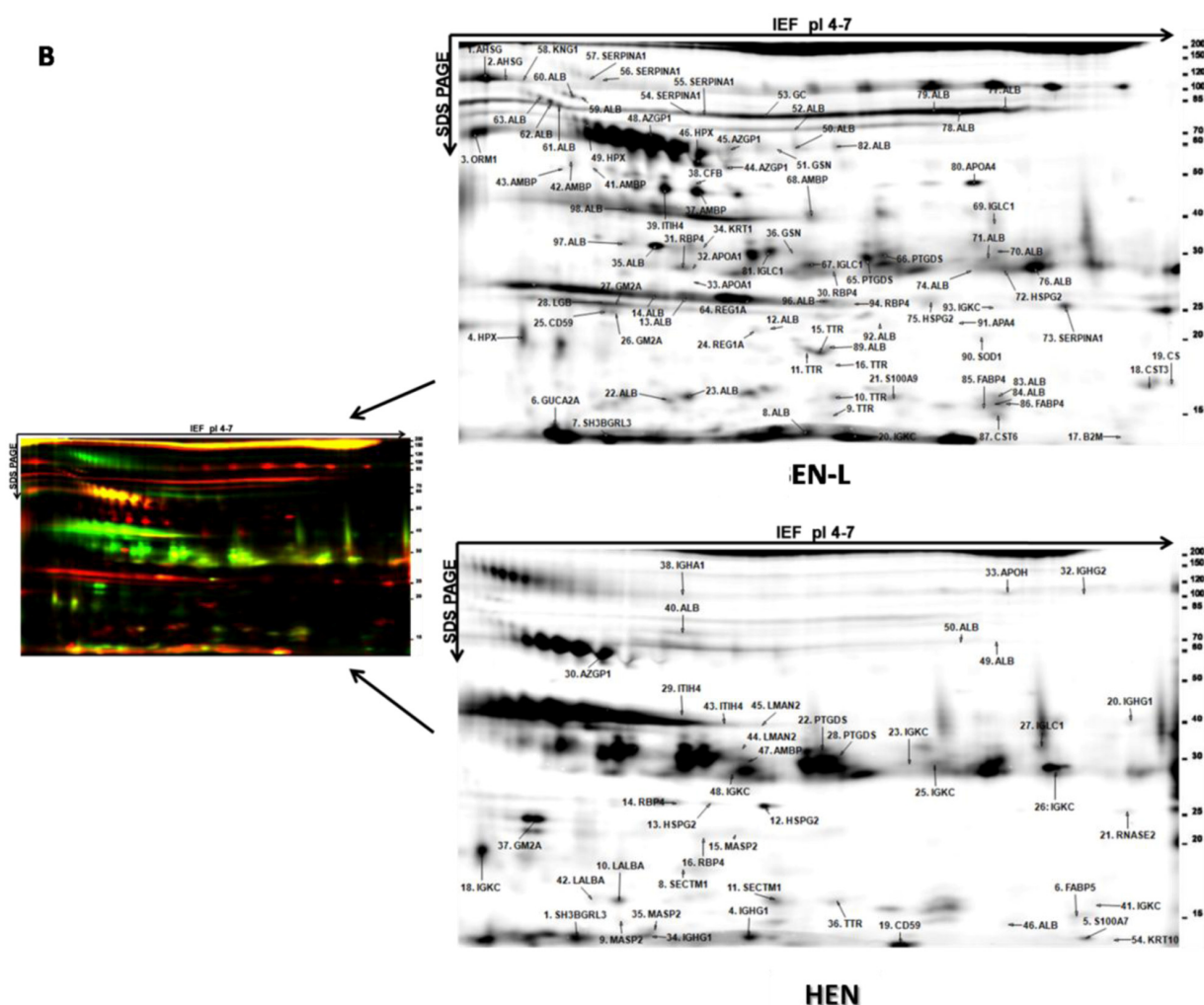
Naziv proteina	Gensko ime	Ulazni kod	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna masa	CPI	PMF-skor	PMF-pokrivenost sekvence	MS/MS scor	Pokrivenost MS/MS sekvence	Peptidi
Alfa-2-HS-glikoprotein	AHSG	gi 112910	P02765	FETUA_HUMAN	40098	5,7	60	37	135	3	7
Serum albumin	ALB	gi 11493459	P02768	ALBU_HUMAN	71317	5,9	234	44	263	9	8
Alfa-metilacil-CoA racemaza	AMACR	gi 13626118	Q9UHK6	AMACR_HUMAN	42675	6,7	56	23	34	11	5
Protein AMBP	AMBP	gi 4502067	P02760	AMBP_HUMAN	14795	5,9	67	29	121	24	17
Apolipoprotein A-I	APOA1	gi 178775	P02647	APOA1_HUMAN	30759	5,5	94	67	79	8	10
Apolipoprotein A-IV	APOA4	gi 178757	P06727	APOA4_HUMAN	45371	5,2	88	31	160	15	14
Apolipoprotein C-II	APOC2	gi 157838337	P02655	APOC2_HUMAN	11277	4,5	58	28	25	1	3
Beta-2-glikoprotein	APOH	gi 28810	P02749	APOH_HUMAN	39584	9,5	107	57	116	37	1
Cink-alfa-2-glikoprotein	AZGP1	gi 141596	P25311	ZA2G_HUMAN	34079	5,5	178	62	248	19	11
Beta-2-mikroglobulin	B2M	gi 34616	P61769	B2MG_HUMAN	13820	6,1	67	58	155	40	7
UPF0553 protein C9orf64	C9orf64	gi 110815802	Q5T6V5	CI064_HUMAN	39460	5,5	66	31	100	26	10
Coiled-coil domen-sadržujući protein 46	CCDC46	gi 82880656	Q8N8E3	CCD46_HUMAN	113192	6,2	65	24	158	14	20
CD59 glikoprotein	CD59	gi 157836404	P13987	CD59_HUMAN	14795	6,1	45	26	98	18	2

Naziv proteina	Gensko ime	Ulazni kod	UniProtKB/ Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna masa	CPI	PMF- skor	PMF- pokrivenost sekvence	MS/MS scor	Pokrivenost MS/MS sekvence	Peptidi
Complement faktor B	CFB	gi 291922	P00751	CFAB_HUMAN	86847	6,7	72	24	99	21	3
Cistatin-C	CST3	gi 181387	P01034	CYTC_HUMAN	16017	9,9	103	62	88	41	12
Cistatin-M	CST6	gi 4503113	Q15828	CYTM_HUMAN	16785	9,5	76	46	135	34	4
Verovatna ATP-zavisna RNA helikaza DDX60	DDX60	gi 82880656	Q81Y21	DDX60_HUMAN	199680	8,4	59	22	68	16	24
Endonucleaza domen-sadržujući 1 protein	ENDOD1	gi 148225659	O94919	ENDD1_HUMAN	55723	5,4	95	36	59	24	3
Masno kiselinski vezujući protein, jetra	FABP1	gi 182356	P07148	FABPL_HUMAN	14256	7,5	57	59	178	53	4
Masno kiselinski vezujući protein, adipociti	FABP4	gi 4557579	P15090	FABP4_HUMAN	14824	7,5	64	70	152	27	3
Masno kiselinski vezujući protein, epidermni	FABP5	gi 4557581	Q01469	FABP5_HUMAN	15497	7,5	130	65	149	23	3
GAS2-kao protein 3	GAS2L3	gi 28372563	Q86XJ1	GA2L3_HUMAN	76022	10,4	71	23	29	1	10
Vitamin D-vezujući protein	GC	gi 139641	P02774	VTDB_HUMAN	54526	5,3	120	47	189	5	16
Gangliosid GM2 activator	GM2A	gi 31853	P17900	SAP3_HUMAN	21281	5	63	16	96	16	2
Guanin nucleotid-vezujući protein subjednica alfa-11	GNA11	gi 115511049	P29992	GNA11_HUMAN	42400	5,4	59	37	75	28	10
Guanilin	GUCA2A	gi 157879468	Q02747	GUC2A_HUMAN	12839	4,4	65	43	132	18	4
Haptoglobin	HP	gi 296653	P00738	HPT_HUMAN	52385	6,1	66	24	58	24	8
Hemopeksin	HPX	gi 386789	P02790	HEMO_HUMAN	52385	6,6	90	25	82	2	1
Bazalna membrana-specifični heparan sulfat proteoglikan površni protein	HSPG2	gi 184427	P98160	PGBM_HUMAN	479221	6,1	80	19	277	1	3
Ig alfa-1 lanac C region	IGHA1	gi 113584	P01876	IGHA1_HUMAN	38486	6,1	75	43	94	25	10
Ig gama-1 lanac C region	IGHG1	gi 34527666	P01857	IGHG1_HUMAN	36596	9,4	47	18	248	18	4
Ig gama-2 lanac C region	IGHG2	gi 10799664	P01859	IGHG2_HUMAN	36505	8,8	96	39	150	13	8
Ig kapa lanac C region	IGKC	gi 218783338	P01834	IGKC_HUMAN	11773	5,5	71	48	313	31	7
Ig lambda lanac C regions	IGLC1	gi 33700	P01842	LAC_HUMAN	11401	7,6	64	18	46	15	3
Inter-alfa-tripsin inhibitor teških lanaca H4	ITIH4	gi 1483187	Q14624	ITIH4_HUMAN	103521	6,5	94	22	78	21	11
Kininogen-1	KNG1	gi 4504893	P01042	KNG1_HUMAN	72996	6,4	196	54	131	3	2
Keratin, tip II citoskeletni 1	KRT1	gi 7331218	P04264	K2C1_HUMAN	66170	8,8	112	40	74	4	16
Keratin, tip I citoskeletni 10	KRT10	gi 28317	P13645	K1C10_HUMAN	59046	5	205	45	80	8	27
Alfa-laktalbumin	LALBA	gi 170684552	P01842	LAC_HUMAN	16692	7,6	86	69	117	49	3
Vezikularni integralni membranski protein VIP36	LMAN2	gi 5803023	Q12907	LMAN2_HUMAN	40545	6,5	106	50	114	16	16

Naziv proteina	Gensko ime	Ulazni kod	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna masa	CPI	PMF-skor	PMF-pokrivenost sekvence	MS/MS scor	Pokrivenost MS/MS sekvence	Peptidi
Manan-vezujući lectin serin proteaza 2	MASP2	gi 50513645	O00187	MASP2_HUMAN	77224	5,4	87	13	175	5	10
Alfa-1-kiselni glikoprotein	ORM1	gi 112877	P02763	A1AG1_HUMAN	23725	4,8	75	47	256	26	9
Pleckstrin homolog domen-sadržujući familija G član 4B	PLEKHG4B	gi 4504165	Q96PX9	PKH4B_HUMAN	141345	6,2	63	20	58	5	16
Protektor telomera protein 1	POT1	gi 56693609	Q9NUX5	POTE1_HUMAN	72309	6,3	61	27	117	7	13
Proteasom sub jedinica alfa tip-7	PSMA7	gi 116283481	O14818	PSA7_HUMAN	28041	9,3	56	42	93	14	7
Prostaglandin-H2 D-isomeraza	PTGDS	gi 32171249	P41222	PTGDS_HUMAN	21243	8,9	64	40	139	34	7
Receptor-tip tirozin-protein fosfataza delta	PTPRD	gi 4506309	P23468	PTPRD_HUMAN	215651	6,1	80	27	63	21	21
Retinol-vezujući protein 4	RBP4	gi 157830446	P02753	RET4_HUMAN	23337	5,7	132	77	196	25	17
Litostatin-1-alfa	REG1A	gi 623413	P05451	REG1A_HUMAN	19118	5,6	111	55	254	23	4
GTP-vezujući protein Rit2	RIT2	gi 4506533	Q99578	RIT2_HUMAN	24880	6,2	49	46	61	44	5
Ne-secretorna ribonukleaza	RNASE2	gi 4506549	P10153	RNAS2_HUMAN	18855	10,6	44	21	116	19	4
Protein S100-A7	S100A7	gi 190668	P31151	S10A7_HUMAN	11578	6,4	110	55	127	33	3
Protein S100-A9	S100A9	gi 4506773	P06702	S10A9_HUMAN	13291	5,7	83	65	224	54	4
Sekretovani transmembranski protein 1	SECTM1	gi 4506869	Q8WVN6	SCTM1_HUMAN	27307	7,9	58	26	224	20	3
Semaphorin-3A	SEMA3A	gi 21669485	Q14563	SEM3A_HUMAN	89916	7,2	60	31	75	23	7
Alfa-1-antitripsin	SERPINA1	gi 177827	P01009	A1AT_HUMAN	46878	5,3	62	25	247	13	12
SH3 domen-vezujući glutamični kiselinski-bogat protein 3	SH3BGL3	gi 13775198	Q9H299	SH3L3_HUMAN	10488	4,7	108	83	186	17	9
Superoksid dizmutaza [Cu-Zn]	SOD1	gi 2982080	P00441	SODC_HUMAN	16154	5,7	66	24	58	24	2
Spastin	SPAST	gi 11875211	Q9UBP0	SPAST_HUMAN	67497	10,3	57	24	76	23	12
Transtiretin	TTR	gi 17942890	P02766	TTHY_HUMAN	15991	5,4	123	65	129	24	5
Xin actin-vezujući protein 2	XIRP2	gi 134270875	A4UGR9	XIRP2_HUMAN	383888	6	102	48	254	20	38

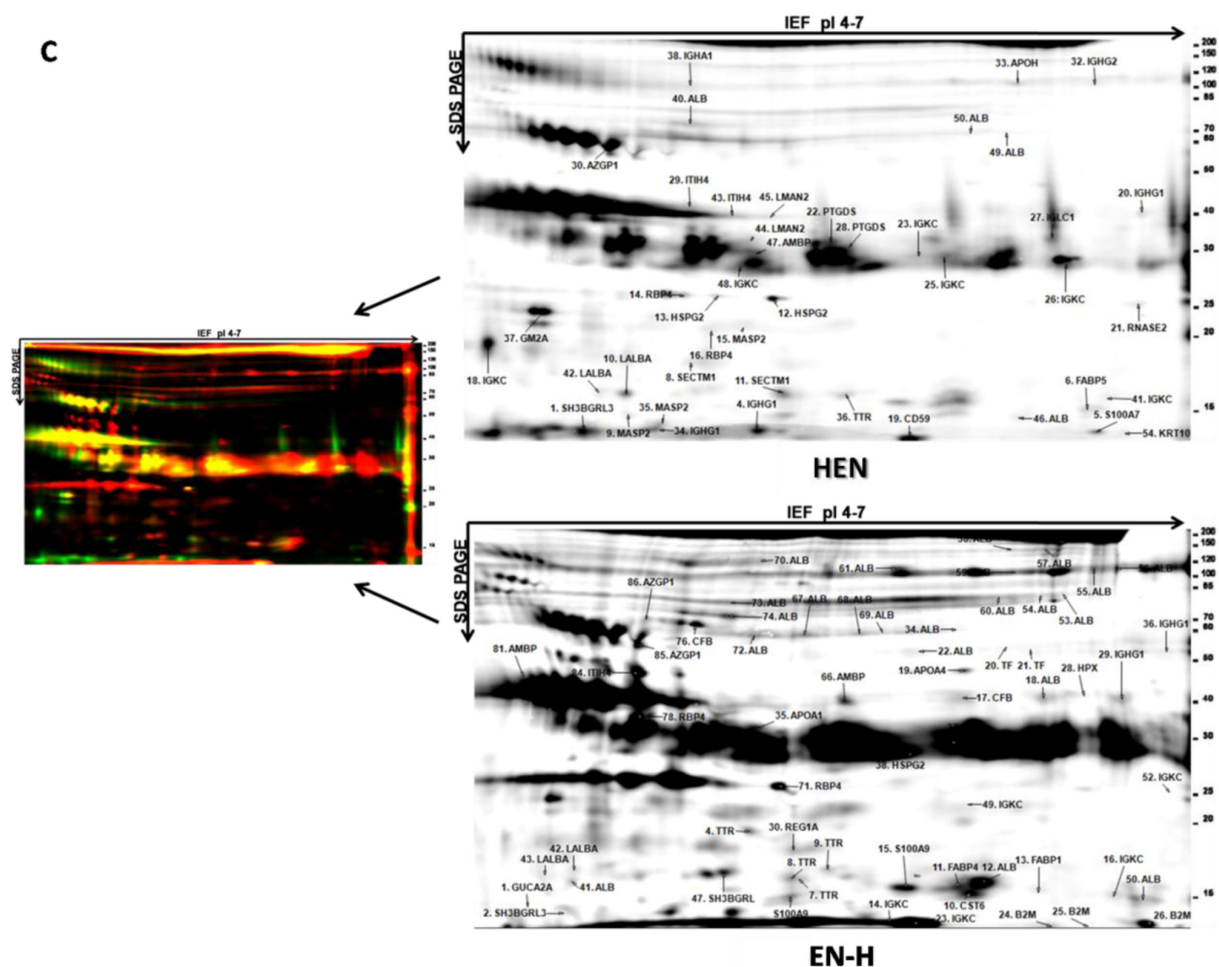
4.4 Komparativna analiza urinarnih proteoma upotrebom 2D-DIGE i identifikacija EN proteinskih markera

Da bi identifikovali proteine koji su diferencijalno izlučivani putem urina EN pacijenata u odnosu na zdravu populaciju i druge eksperimentalne grupe, sa visokom reproducibilnošću i statističkom značajnošću, uradili smo 2D-DIGE analize zbirnih uzoraka (5 zbirnih uzoraka po grupi) i uporedili medju grupama dobijene mape proteoma. Intenzitet svake proteinske tačke je semikvantifikovan upotrebom Delta 2D software-a a izražen je procentualnom vrednošću koja odgovara volumenu određene tačke na slici gela. Kreirane su 2D-DIGE proteinske mape u pI 4-7 rangu (Slika 2, 3). Kao što je i očekivano, veća količina proteina pronađena je u urinu bubrežnih bolesnika u poređenju sa zdravom populacijom (Slika 2, 3).



Slika 2. 2D-DIGE slika proteina u HEN urinu (grupa 1, zelena boja) i pacijenata sa EN L (grupa 2, crvena boja) – slika levo; identifikovani proteini su obeleženi na gelu njihovim genskim imenima – slika desno. Proteini su razdvojeni na osnovu njihove izoelektrične tačke u 4-7 pI rangu upotrebom IEF, a u zavisnosti od njihove molekularne mase na 12% SDS PAGE gelu. Intenzitet boje svake tačke indirektno odražava količinu ekskretovanog proteina u urinu. Proteini sa sličnom koncentracijom a istom pI i molekularnom masom, nalaze se na istom mestu na gelu i markirani su žutom bojom. HEN – zdravi dobrovoljci koji žive u endemskim područjima; EN L – pacijenti sa endemskom nafropatijom i niskim vrednostima proteinurije

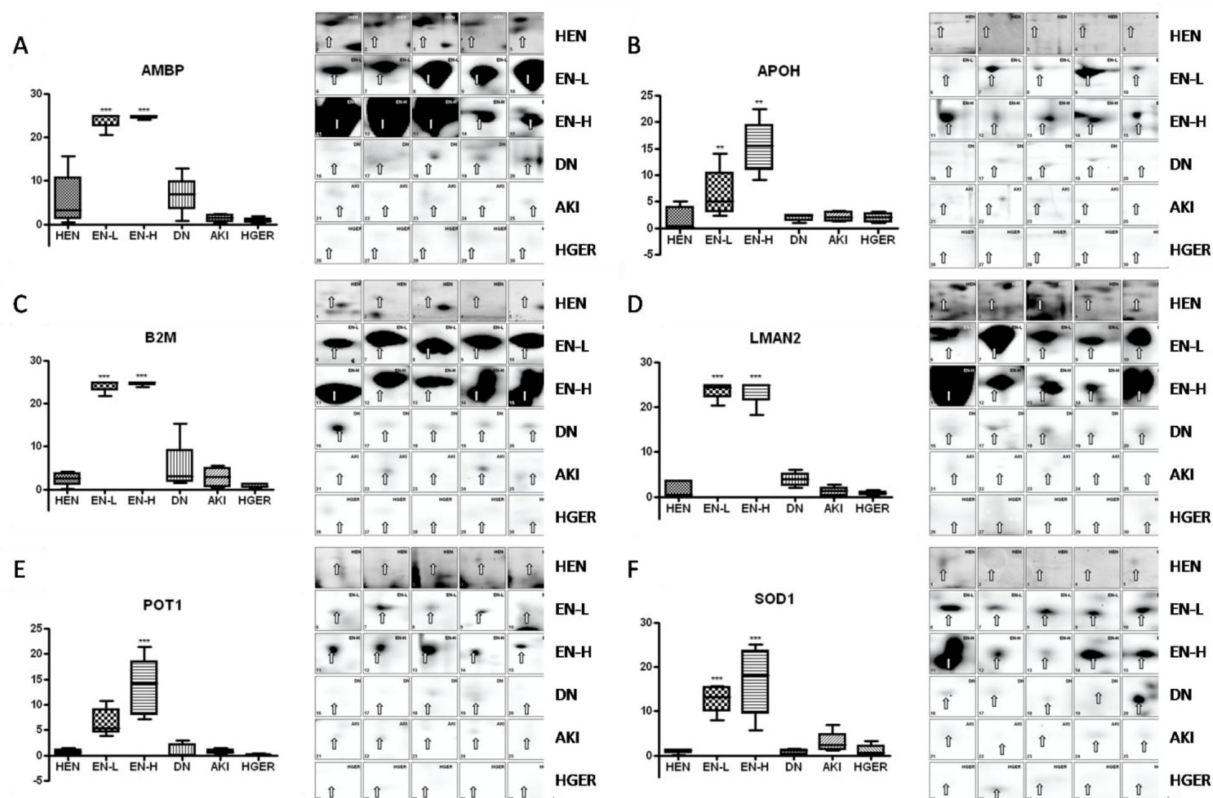
Kvantitativna i kvalitativna analiza 2D-DIGE mapa pomoću Delta 2D i Prizma4 software-a dokazala je značajnu razliku u ekskreciji 43 proteina u urinu EN pacijenata za razliku od zdrave populacije iz endemičkih područja (**Tabela 2, Slika 2, 3**), ali daljim ispitivanjem razlike u ekskreciji ovih proteina putem urina ispitanika u drugim grupama, izdvaja se patent od 6 različitih proteina identifikovanih kao α 1-mikroglobulin (AMBP), β -2-glikoprotein 1 (APOH), β 2-mikroglobulin (B2M), manozna-vezujući lektin 2 (LMAN2), protektivni protein telomera 1 (POT1) i superoksid dizmutaza [Cu-Zn] (SOD1), značajno ($p < 0.001$) veće koncentracije u urinu EN pacijenata u odnosu na ostale eksperimentalne grupe (**Slika 4**).



Slika 3. 2D-DIGE slika proteina u HEN urinu (grupa 1, zelena boja) i pacijenata sa EN H (grupa 3, crvena boja) – slika levo; identifikovani proteini su obeleženi na gelu njihovim genskim imenima – slika desno. Proteini su razdvojeni na osnovu njihove izoelektrične tačke u 4-7 pI rangu upotrebom IEF, a u zavisnosti od njihove molekularne mase na 12% SDS PAGE gelu. Intenzitet boje svake tačke indirektno odražava količinu ekskretovanog proteina u urinu. Proteini sa sličnom koncentracijom a istom pI i molekularnom masom, nalaze se na istom mestu na gelu i markirani su žutom bojom. HEN – zdravi dobrovoljci koji žive u endemskim područjima; EN H – pacijenti sa endemskom nefropatijom i visokim vrednostima proteinurije

Tabela 2. Urinarni proteini identifikovani u uzorcima HEN, EN L i EN H koji se značajno različito eksprimiraju u zavisnosti od ispitivane grupe, predstavljeni su u tabeli. Odnos intenziteta gustine i volumena proteinskih tačaka na jednom gelu u poređenju sa drugim smatra se statistički značajnim za vrednosti veće od 2 ili vrednosti manje od 0,5. Analiza intenziteta gustine i volumena proteinskih tačaka, kao i izračunavanje odnosa vrednosti između ispitivanih grupa, izvršena je pomoću Delta 2D software-a. *proteini koji su takođe diferencijalno eksprimirani ali nisu specifični za EN

Protein (gensko ime)	Odnos EN L/HEN	Odnos EN H/HEN
ALB*	2,53	4,24
AMB*	1,95	2,24
APOA1	0,33	0,16
APOA4*	3,67	2,33
APOH*	2,21	2,73
AZGP1	2,00	0,59
B2M*	1,61	3,28
CCDC46	3,81	2,70
CD59	3,00	0,45
CFB	4,62	3,20
CST3	6,52	8,52
CST6	11,33	11,23
FABP1*	1,39	1,01
FABP4*	2,84	2,66
GC	2,06	1,62
GM2A	1,10	1,09
GUCA2A	0,56	0,16
HPX	2,33	0,81
HSPG2	1,96	1,72
IGHA1	20,24	10,23
IGHG1	0,97	0,38
IGHG2	4,80	2,43
IGKC	2,56	2,41
IGLC1	2,53	2,44
ITIH4	2,34	0,88
KNG1	0,57	0,29
KRT1	3,28	1,68
KRT10	11,20	4,78
LMAN2*	1,10	1,65
MASP2	2,46	1,42
POT1*	1,61	3,28
PSMA7	1,36	0,79
PTGDS	0,88	1,04
RBP4*	3,17	2,91
REG1A*	6,69	5,22
RNASE2	0,29	0,20
S100A7*	0,00	0,00
S100A9*	5,34	2,99
SECTM1	1,30	0,84
SERPINA1	0,92	0,53
SH3BGRL3	0,52	0,87
SOD1*	163,67	102,33
TTR	7,68	3,23

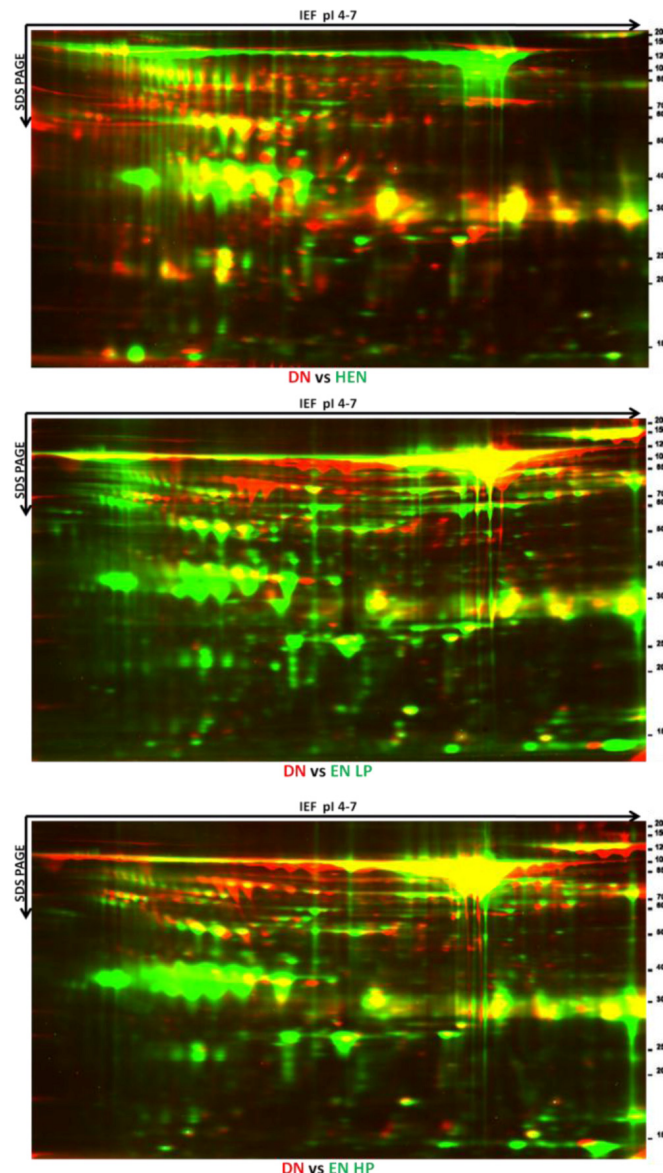


Slika 4. Grafička prezentacija razdvojenih proteinskih tačaka 2D-DIGE metodom sa uvećanjem ekvivalentnih regiona na gelovima različitih grupa na kojima se nalaze proteini koji se u značajno većem volumenu ekskretuju urinom EN L i EN H pacijenata u odnosu na HEN, DN, AKI i HGER. Na y osi grafika prikazane su procentualne vrednosti volumena tačaka, dok je na x osi predstavljena distribucija vrednosti duž odgovarajuće grupe u odnosu na ispitivanu tačku. Proteini su predstavljeni njihovim genetičkim imenima. Proteini prezentovani na ovoj slici ispunjuju kriterijume da postanu EN potencijalni markeri: α 1-mikroglobulin (AMBP), β -2-glikoprotein 1 (APOH), β 2-mikroglobulin (B2M), manozna-vezujućii lektin 2 (LMAN2), protektivni protein telomera 1 (POT1) i superoksid dizmutaza [Cu-Zn] (SOD1). Statistička analiza podataka urađena je u Prizma 4 software-u (**p<0,01, ***p<0,001).

4.5 Komparativna analiza urinarnih proteoma DN i EN pacijenata upotrebom 2D-DIGE i identifikacija proteinskih markera glomerularnog oštećenja u urinu EN pacijenata

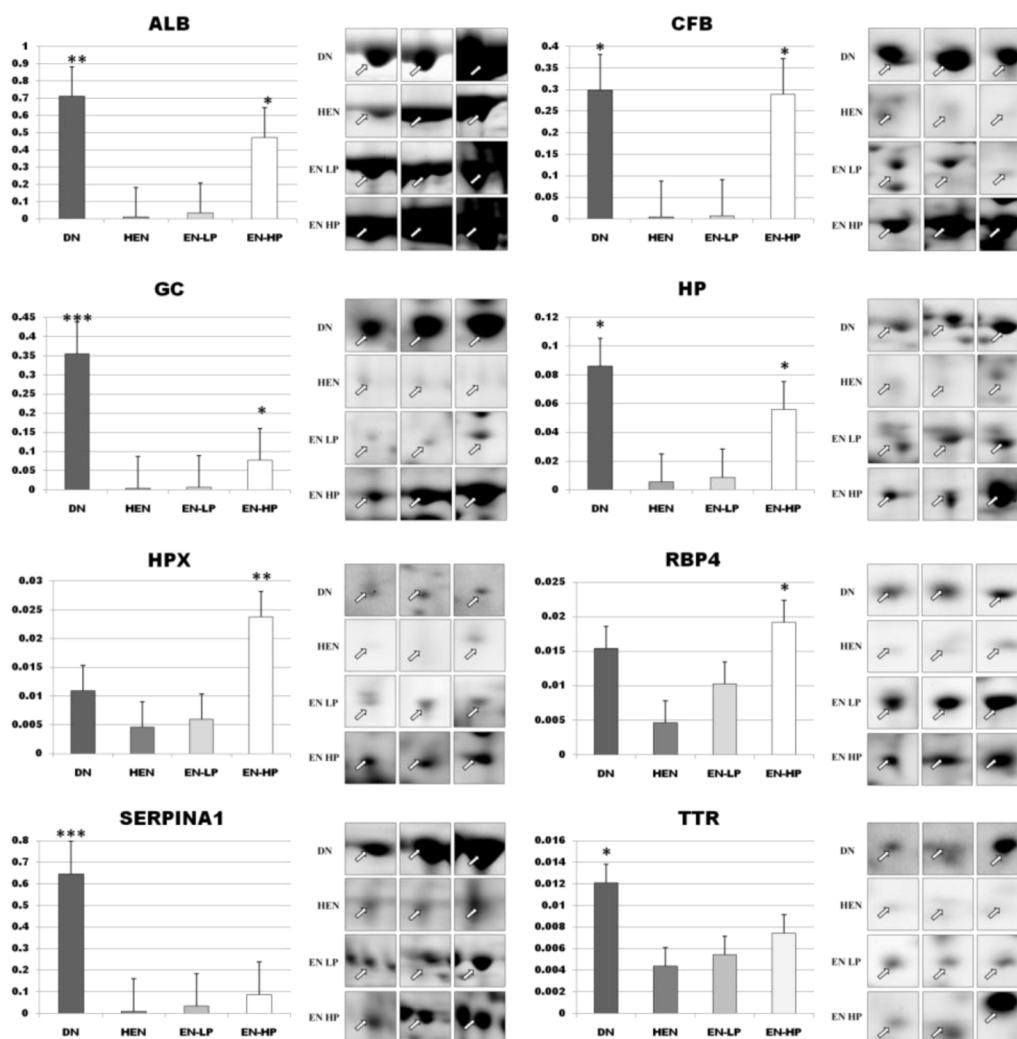
Da bi identifikovali proteine koji se smatraju markerima glomerularnog oštećenja (albumin, α -1-antitripsin, haptoglobin, hemopeksin, retinol vezujućii protein, vitamin D vezujućii protein, transtiretin i komplement faktor B) i diferencijalno su izlučivani putem urina EN pacijenata u odnosu na pacijente sa DN-om, sa visokom reproducibilnošću i statističkom značajnošću, uradili smo 2D-DIGE analize zbirnih uzoraka (5 zbirnih uzoraka po grupi) i uporedili među grupama dobijene mape proteoma.

Intenzitet svake proteinske tačke je semikvantifikovan upotrebom Delta 2D software-a a izražen je procentualnom vrednošću koja odgovara volumenu određene tačke na slici gela. Kreirane su 2D-DIGE proteinske mape u 4-7 pI rangu (**Slika 5**). Dobijeni rezultati su pokazali značajne razlike u kvalitetu proteoma urina pacijenta sa dijabetesnom nefropatijom, zdravih ispitanika koji naseljavaju endemska područja, pacijenata sa endemskom nefropatijom i niskim (ispod 150 mg/L proteina u urinu) i visokim vrednostima (preko 150 mg/L proteina u urinu) proteinurije.



Slika 5. 2D-DIGE slika proteina u urinu DN pacijenata (crvena boja) i HEN (slika gore), EN L (slika u sredini), EN H (slika dole). Proteini su razdvojeni na osnovu njihove izoelektrične tačke u 4-7 pI rangu upotrebom IEF, a u zavisnosti od njihove molekularne mase na 12% SDS PAGE gelu. Intezitet boje svake tačke indirektno odražava količinu ekskretovanog proteina u urinu. Proteini sa sličnom koncentracijom a istom pI i molekularnom masom, nalaze se na istom mestu na gelu i markirani su žutom bojom. HEN – zdravi dobrovoljci koji žive u endemskim područjima; EN LP – pacijenti sa endemskom nefropatijom i niskim vrednostima proteinurije i EN HP – pacijenti sa endemskom nefropatijom i visokim vrednostima proteinurije

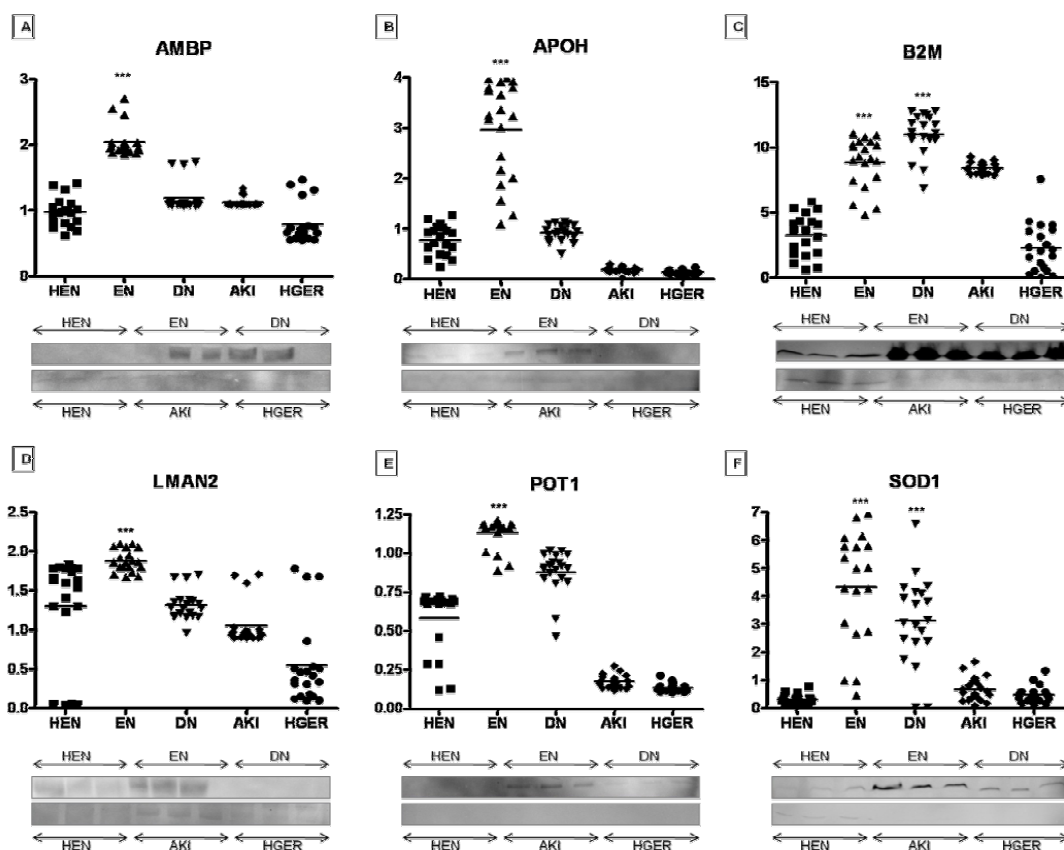
Kvantitativna i kvalitativna analiza 2D-DIGE mapa pomoću Delta 2D i Prizma4 software-a dokazala je značajnu razliku u ekskreciji markera glomerularnog oštećenja. Prisustvo markera glomerulskog oštećenja u urinu DN pacijenata značajno je povišeno u odnosu na urin EN pacijenata. Marker glomerulskog oštećenja se značajnije javljaju u urinu EN pacijenata u odmaklom stadijumu bolesti u poređenju sa urinom zdravih dobrovoljaca uz endemskih područja, što pored oštećenja tubula ukazuje na dodatno oštećenje glomerula (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (Slika 6).



Slika 6. Grafička prezentacija razdvojenih proteinskih tačaka 2D-DIGE metodom sa uvećanjem ekvivalentnih regiona na gelovima različitih grupa na kojima se nalaze proteini koji se u značajno većem volumenu ekskretuju urinom DN pacijenata u odnosu na EN L i EN H. Na y osi grafika prikazane su procentualne vrednosti volumena tačaka, dok je na x osi predstavljena distribucija vrednosti duž odgovarajuće grupe u odnosu na ispitivanu tačku. Proteini su predstavljeni njihovim genetičkim imenima. Proteini prezentovani na ovoj slici predstavljaju markere glomerularnog oštećenja: albumin (ALB), α -1-antitripsin (SERPINA1), haptoglobin (HP), hemopeksin (HPX), retinol vezujući protein (RBP4), vitamin D vezujući protein (GC), transtiretin (TTR) i komplement faktor B (CFB). Statistička analiza podataka urađena je u Prizma 4 software-u (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.6 Imunološko potvrđivanje identifikovanih EN proteinskih markera

Da bi ispitali validnost proteomskih analiza i potvrdili potencijalnu ulogu ispitivanih proteina kao markera EN-a, koristili smo Western blot analizu. Podaci dobijeni nakon imunoblot eksperimenta potvrdili su rezultate dobijene proteomskim analizama (**Slika 5**). Rezultati prikazuju značajnu razliku u nivou ekskrecije šest proteina, AMBP, APOH, B2M, LMAN2, POT1 i SOD1 u zavisnosti od ispitivane grupe. Najveća količina izlučenih proteina pronađena je u uzorcima EN pacijenata, značajno veća u poređenju sa uzorcima DN pacijenata ($p < 0,001$, ANOVA) i sa uzorcima HEN-a ($p < 0,001$, ANOVA). Nalaz ovih proteina u uzorcima urina pacijenata sa prerenalnom AKI i HGER bio je gotovo negativan ($p < 0,001$, ANOVA). Povišene vrednosti proteina nađene su u urinu zdravih dobrovoljaca iz EN regiona u odnosu na urin pacijenata sa prerenalnom AKI i HGER ($p < 0,001$, ANOVA) (**Grafikon 3**).



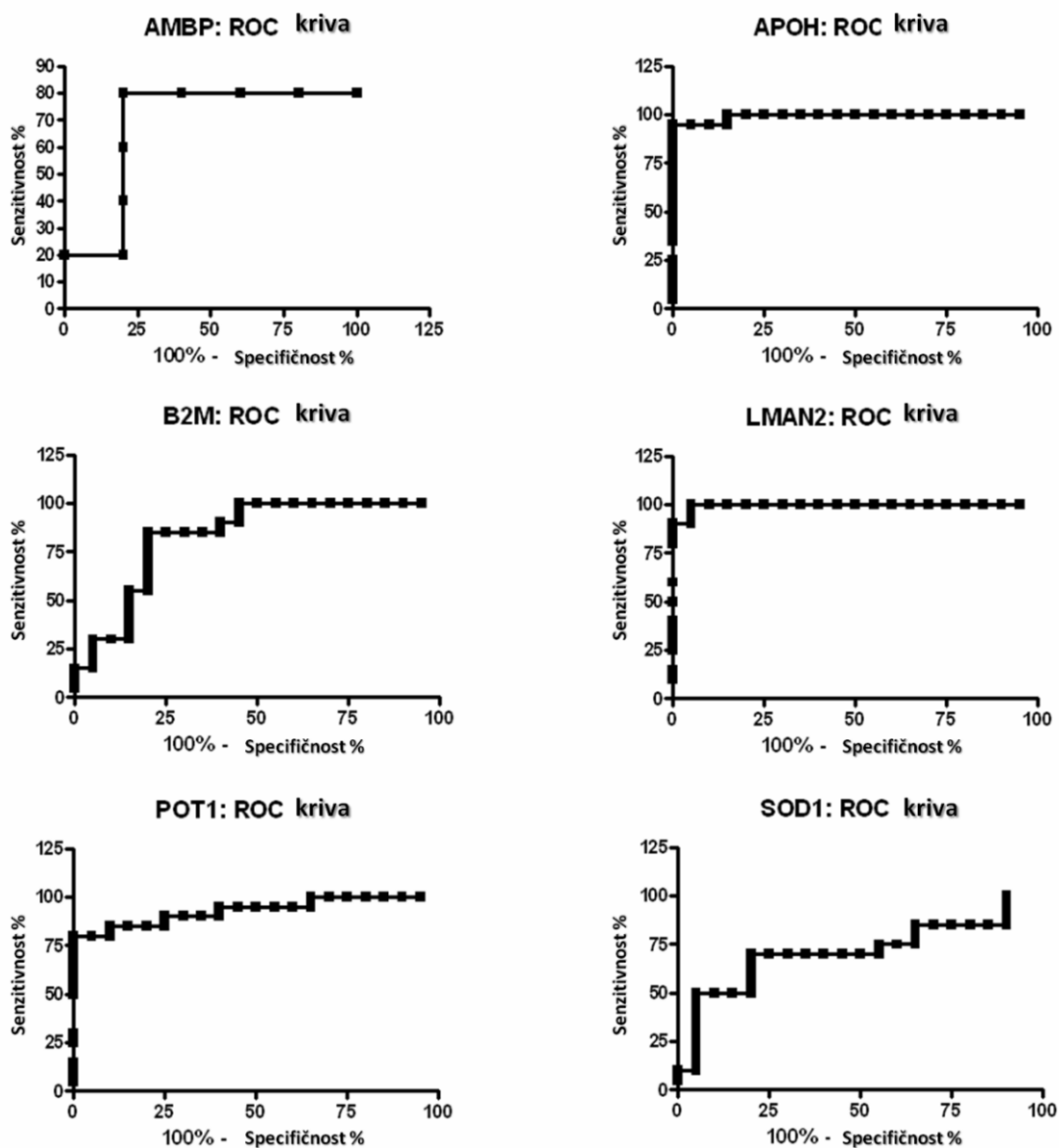
Grafikon 3. Fluorescentna Western blot analiza značajnih proteina koji su predhodno identifikovani 2-DE analizom u urinu ispitanika HEN, EN, DN, AKI i HGER. U ovoj analizi korišćena su specifična antitela protiv α 1-mikroglobulina (AMBP), β -2-glikoproteina 1 (APOH), β 2-mikroglobulina (B2M), manozna-vezujućeg lektina 2 (LMAN2), protektivnog proteina telomera 1 (POT1) i superoksid dizmutaze [Cu-Zn] (SOD1). Na y osi grafika prikazane su procentualne vrednosti volumena blot linija, dok je na x osi predstavljena distribucija vrednosti duž odgovarajuće ispitivane grupe. Slika detektovanih proteina na blot membrani prikazana je ispod svakog grafikona. Statistička analiza podataka urađena je u Prizma 4 software-u (***) $p < 0,001$.

Uz pomoć ROC krive, AUC analize sa 95% intervalom pouzdanosti (CI) (**Grafikon 4**) ispitivana je značajnost istaknutih urinarnih proteina kao potencijalnih dijagnostičkih markera. Rezultati su pokazali da identifikovani proteinski markeri mogu da diferenciraju sa velikom specifičnošću (Sp) i senzitivnošću (Sn) EN od DN, AKI, HEN i HGER (**Tabela 3**). Izmerene koncentracije AMBP (95% CI, cut-off>2,687; (67% - 100%) Sn; (55% - 85%) Sp), APOH (95% CI, cut-off>0,4309; (84%-100%) Sn; (32%-78%) Sp), B2M (95% CI, cut-off>1,353; (84%-100%) Sn; (32%-78%) Sp), LMAN2 (95% CI, cut-off>0,0520; (84%-100%) Sn; (67%-99%) Sp), POT1 (95% CI, cut-off>0,2885; (84%-100%) Sn; (37%-89%) Sp) i SOD1 (95% CI, cut-off>0,1348; (84%-100%) Sn; (32%-78%) Sp) u urinu EN pacijenata predstavljaju značajno veće vrednosti od onih u urinu HEN ispitanika ($p<0,001$) (**Tabela 3**). ROC grafikoni identifikovanih proteina ukazuju na njihovu prediktivnu ulogu u pravilnoj dijagnostici EN oboljenja i diferenciranju u odnosu na druge bolesti sa velikom pouzdanošću (95%CI, $p<0,001$, **Grafikon 4**).

Tabela 3. Rezultati analize ekskrecije šest urinarnih proteina dobijenih tehnikom Western blota pomoću ROC krive: upoređivanje dobijenih vrednosti HEN, DN, AKI i HGER sa EN; Sn – senzitivnost, Sp – specifičnost, dif. AUC – razlika u površini ispod krive

Marker	HEN vs. EN					DN vs. EN				
	Granične vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	Granične vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p
AMBP	>2,687	67% to 100%	55% to 85%	1	$p<0,01$	<2,433	51% to 76%	29% to 99%	0,54	nije značajno
APOH	>0,4309	84% to 100%	32% to 78%	0,99	$p<0,001$	>0,7569	84% to 100%	57% to 96%	0,995	$p<0,001$
B2M	>1,353	84% to 100%	32% to 78%	0,9825	$p<0,001$	<6,897	32% to 78%	75% to 99%	0,83	$p<0,001$
LMAN2	>0,0520	84% to 100%	67% to 99%	0,9213	$p<0,001$	>1,163	84% to 100%	57% to 96%	0,995	$p<0,001$
POT1	>0,2885	84% to 100%	37% to 89%	1	$p<0,001$	>0,8122	84% to 100%	32% to 89%	0,93	$p<0,001$
SOD1	>0,1348	84% to 100%	32% to 78%	0,9925	$p<0,001$	>0,9725	69% to 99%	35% to 70%	0,7125	$p<0,05$

Marker	AKI vs. EN					HGER vs. EN				
	Cut-off	Sn	Sp	Dif. AUC	p	Cut-off	Sn	Sp	Dif. AUC	p
AMBP	>6,652	48% to 100%	52% to 85%	1	$p<0,01$	>1,796	48% to 100%	86% to 94%	1	$p<0,01$
APOH	>0,1499	84% to 100%	87% to 91%	1	$p<0,001$	>0,1142	84% to 100%	87% to 99%	1	$p<0,001$
B2M	>6,255	62% to 97%	70% to 84%	0,6775	nije značajno	>0,3140	84% to 100%	70% to 89%	0,9875	$p<0,001$
LMAN2	>0,8976	84% to 100%	8% to 49%	0,99	$p<0,001$	>0,3409	84% to 100%	86% to 100%	0,985	$p<0,001$
POT1	>0,1347	84% to 100%	3% to 37%	1	$p<0,001$	>0,1109	84% to 100%	87% to 100%	1	$p<0,001$
SOD1	>0,2615	84% to 100%	3% to 38%	0,9475	$p<0,001$	>0,2201	84% to 100%	81% to 100%	0,97	$p<0,001$

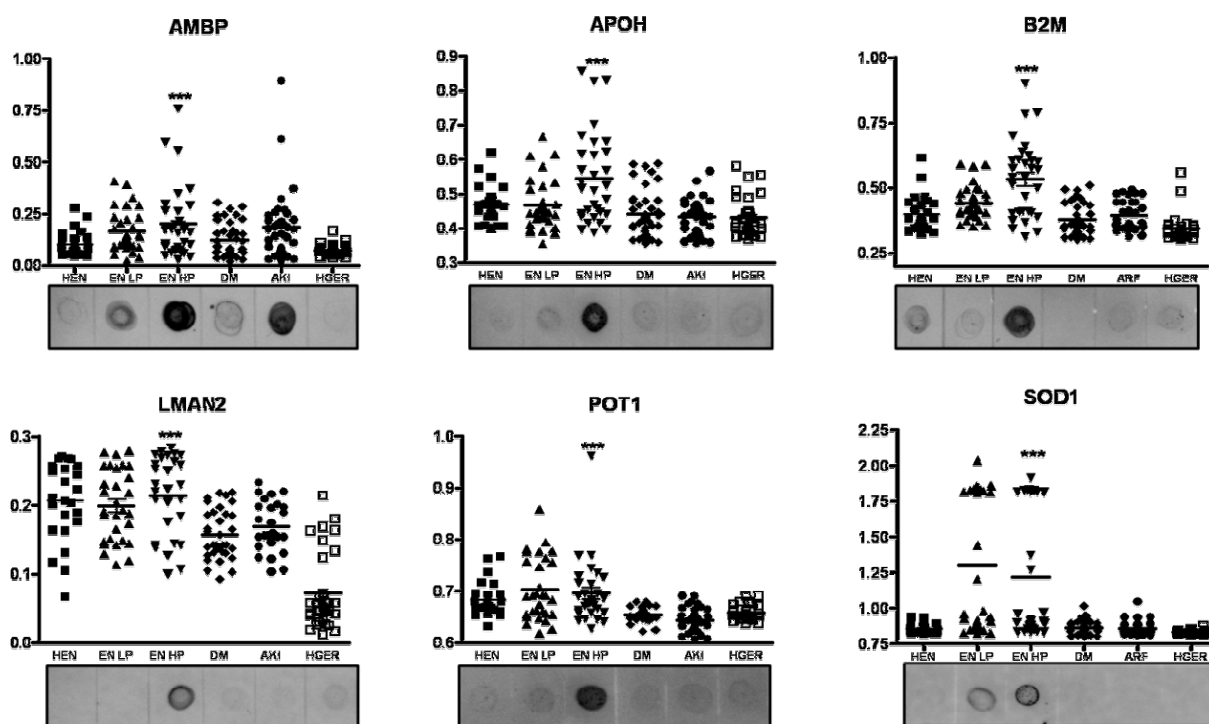


Grafikon 4. Grafikoni ROC funkcije: statistička analiza je izvedena u Prizma 4 software programu. Ispitivanjem su obuhvaćeni podaci Western blot analize šest specifičnih proteina koji diferenciraju urin EN pacijenata od ostalih grupa (HEN, DN, AKI, HGER). Analizirana je specifičnost i senzitivnost sledećih proteina: AMBP, APOH, B2M, LMAN2, POT1 i SOD1, što je pokazalo da se mogu koristiti kao prediktori postojanja oboljenja sa visokom sposobnošću diskriminacije u odnosu na druge ispitivane bolesti (95% CI, $p < 0,001$)

4.7 Validnost EN markera ispitivana na većem polulacionom uzorku

Da bi se ispitala korisnost identifikovanih EN markera u dijagnostičke svrhe, dot blot analiza je izvršena na velikom uzorku ispitanika. Statistička analiza rezultata potvrdila je sa visokom signifikantnošću povećanu ekskreciju ovih šest proteina putem urina EN L i EN H pacijenata u odnosu na druge ispitivane grupe (AKI, DN, HGER) ($p < 0,001$, ANOVA).

Ovi proteini su pronađeni i u urinu HEN ispitanika, u značajno većoj koncentraciji u odnosu na vrednosti u urinu HGER ispitanika (**Grafikon 5**).



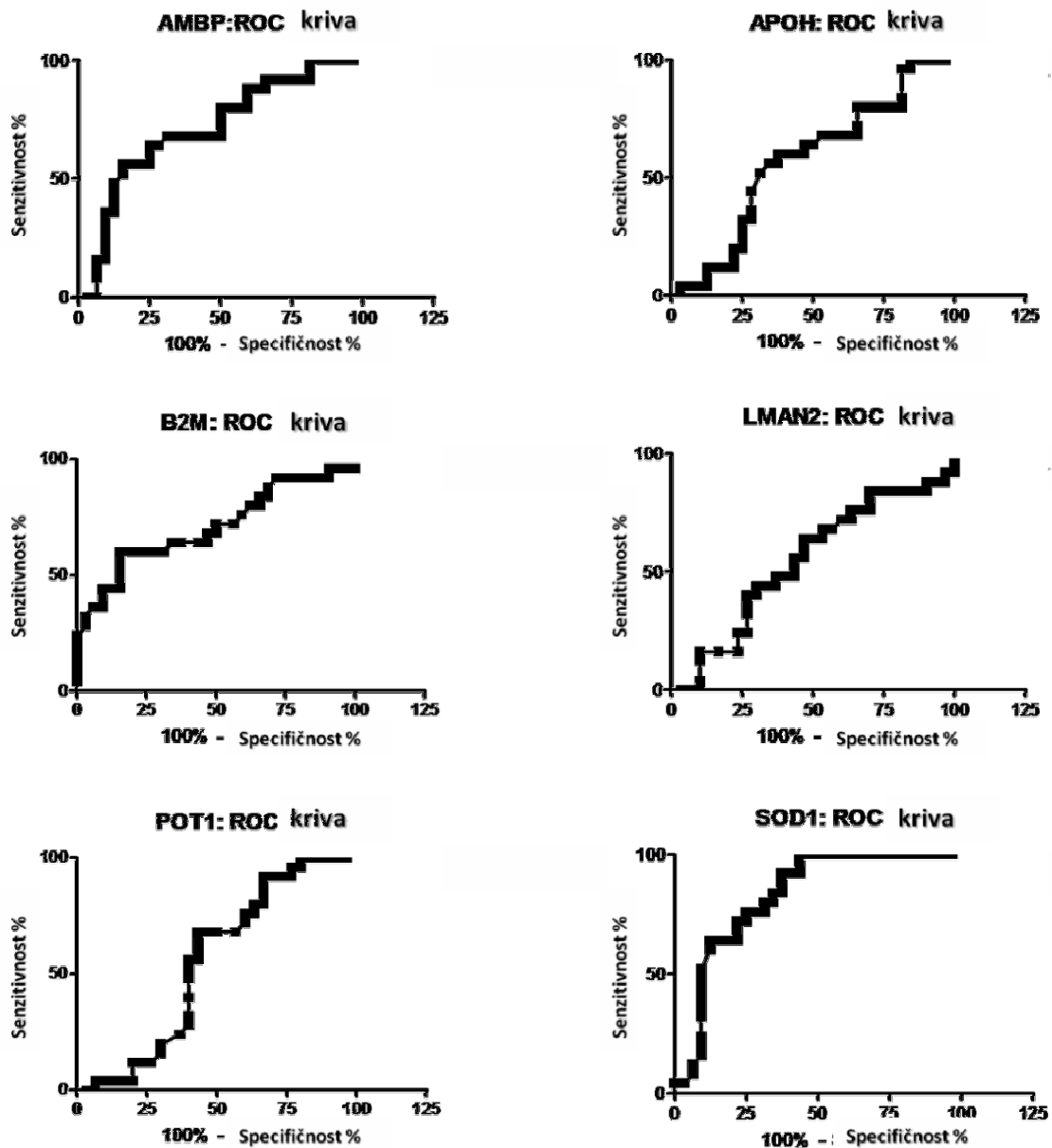
Grafikon 5. Dot blot analiza šest značajnih proteina koji su prethodno identifikovani proteomskim ispitivanjima u urinu HEN, EN L i EN H na velikom broju ispitanika (HEN, EN L, EN H, DN, AKI, HGER). Korišćena su specifična antitela protiv AMBP, APOH, B2M, LMAN2, POT1 i SOD1. Na y osi svakog grafikona prikazane su procentualne vrednosti volumena blot krugova, dok je na x osi predstavljena distribucija vrednosti duž odgovarajuće ispitivane grupe. Slika detektovanih proteina na blot membrani prikazana je ispod svakog grafikona. Statistička analiza podataka urađena je u Prizma 4 software-u (***) $p < 0,001$.

Uz pomoć ROC krive, AUC analize sa 95% intervalom pouzdanosti (CI) (**Grafikon 6**) ispitivana je značajnost istaknutih urinarnih proteina kao potencijalnih dijagnostičkih markera. Rezultati su potvrdili jasnu diskriminaciju pacijenata sa EN L i EN H u odnosu na grupe pacijenata sa AKI i DN i zdravih dobrovoljaca HGER (**Tabela 4**).

Nalazi APOH, POT1 i LMAN2 u urinu HEN gotovo da se nalaze u istoj količini bez statističke značajne razlike, kao u uzorcima urina EN L pacijenta.

U uzorcima EN H pacijenata, vrednosti AUC za B2M (0,780), (0,706) i SOD1 (0,808) veće su u odnosu na ostale markere, APOH (0,649), POT1 (0,554) i LMAN2 (0,567). DN pacijenti imali su značajno niske vrednosti urinarnih AMBP, B2M, LMAN2, POT1 i SOD1 u odnosu na obe grupe EN pacijenata (AUC je bio u rangi od 0,648 do 0,806). APOH (0,760) je imao značajno nižu vrednost u urinu DN pacijenata u poređenju sa EN H.

U urinu EN L i EN H pacijenata AUC vrednosti za svih šest urinarnih markera bile su značajno veće u odnosu na urin HGER, u rangu od 0,679 do 0,942. AUC vrednosti za urinarne markere B2M, LMAN2, POT1 i SOD1 bile su značajno niže kod pacijenata sa AKI u odnosu na EN L pacijente (u rangu od 0,653 do 0,838), dok su i vrednosti za APOH u poređenju sa nalazom u urinu EN H pacijenta značajno niže (0,775).



Grafikon 6. Grafikoni ROC funkcije: statistička analiza je izvedena u Prizma 4 software programu. Ispitivanjem su obuhvaćeni podaci dot blot analize šest specifičnih proteina koji diferenciraju urin EN pacijenata (EN L, EN H) od ostalih grupa (HEN, DN, AKI, HGER). Analizirana je specifičnost i senzitivnost sledećih proteina: AMBP, APOH, B2M, LMAN2, POT1 i SOD1, čime je dokazana validnost markera kao prediktora postojanja oboljenja sa visokom sposobnošću diskriminacije u odnosu na druge ispitivane bolesti (95% CI, $p < 0,001$)

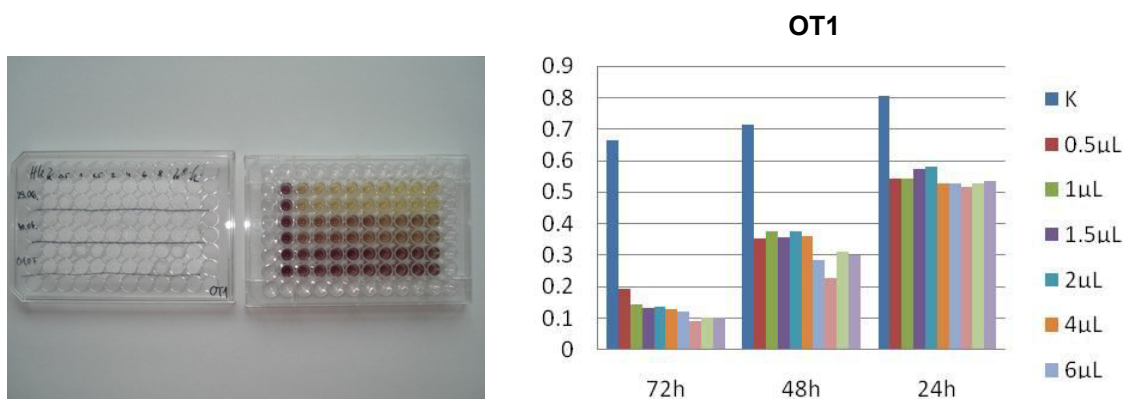
Tabela 4. Rezultati dot blot analize ekskrecije šest urinarnih proteina pomoću ROC krive: upoređivanje dobijenih vrednosti HEN, DN, AKI i HGER sa EN; Sn – senzitivnost, Sp – specifičnost, dif. AUC – razlika u površini ispod krive

Marker	HEN vs. EN L			DN vs. EN L			AKI vs. EN L			HGER vs. EN L						
	Granična vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	Granična vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	Granična vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	
AMBP	<0,0720	40,00	80,65	0,6987	p<0,05	<0,0840	52,50	87,50	0,648	p<0,05	<0,2385	77,50	18,75	0,5031	nije značajno	p<0,001
APOH	>0,4035	96,00	18,75	0,5738	nije značajno	<0,4505	65,00	46,88	0,616	nije značajno	<0,4085	36,67	81,25	0,6198	nije značajno	p<0,05
B2M	<0,3835	56,00	84,38	0,7063	p<0,01	<0,3855	65,00	84,38	0,766	p<0,001	<0,3695	55,56	90,63	0,7201	p<0,01	p<0,001
LMAN2	>0,1885	68,00	46,67	0,5433	nije značajno	<0,1405	41,18	90,00	0,7441	p<0,001	<0,1425	40,78	86,67	0,6532	p<0,05	p<0,001
POT1	<0,6725	56,00	60,00	0,55	nije značajno	<0,6545	58,33	80,00	0,7556	p<0,01	<0,6465	57,14	86,67	0,8257	p<0,001	p<0,01
SOD1	<0,8435	52,00	90,63	0,8263	p<0,001	<0,8545	55,00	81,25	0,8066	p<0,001	<0,8830	80,00	68,75	0,8383	p<0,001	p<0,001

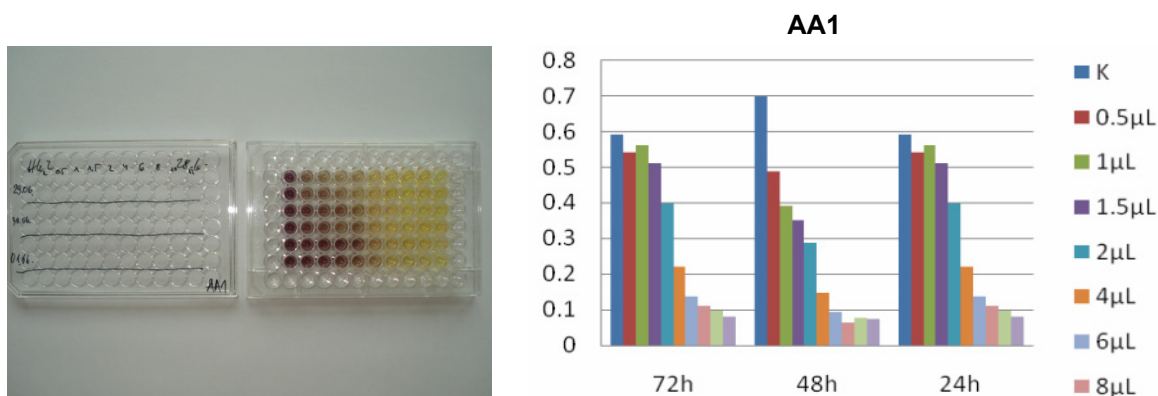
Marker	HEN vs. EN H			DN vs. EN H			AKI vs. EN H			HGER vs. EN H						
	Granična vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	Granična vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	Granična vrednosti	Sn	Sp	Dif. AUC	p	
AMBP	<0,0820	48,00	70,97	0,7063	p<0,01	<0,0765	47,50	77,42	0,6548	p<0,05	<0,2465	80,00	29,30	0,5141	nije značajno	p<0,001
APOH	<0,5515	92,00	41,94	0,649	nije značajno	<0,4350	57,5	80,67	0,7601	p<0,001	<0,4955	90,00	54,84	0,7753	p<0,001	p<0,001
B2M	<0,4360	72,00	64,52	0,7806	p<0,001	<0,4000	70,00	80,65	0,8355	p<0,001	<0,3665	55,56	90,32	0,7984	p<0,001	p<0,001
LMAN2	<0,2155	52,00	57,14	0,5679	nije značajno	<0,1935	79,41	71,43	0,7883	p<0,001	<0,1750	57,69	75,00	0,7356	p<0,01	p<0,001
POT1	<0,6705	56,00	66,67	0,5547	nije značajno	<0,6560	58,33	83,33	0,7813	p<0,001	<0,6555	74,29	83,33	0,8443	p<0,001	p<0,001
SOD1	<0,8820	76,00	67,74	0,8084	p<0,001	<0,8355	25,00	90,32	0,7758	p<0,001	<0,8625	70,00	74,19	0,8222	p<0,001	p<0,001

4.8 Test ćelijske vijabilnosti (MTT test)

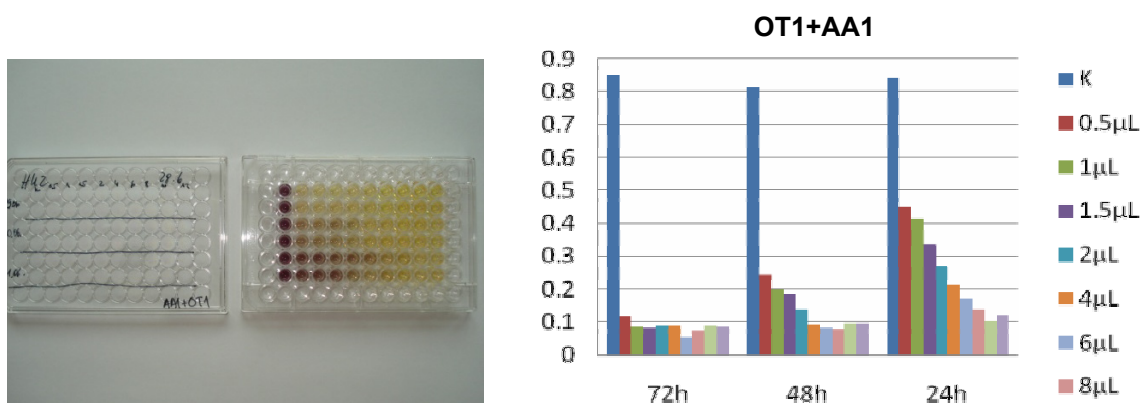
Vijabilnost humanih tubulocita (HK2) ispitivana je MTT esejom nakon primenjenih tretmana. HK2 su izlagane u različitim vremenskim intervalima rastućim koncentracijama toksina, ohratoksina A (OTA) (**slika 7**), aristilohijske kiseline 1 (AA1) (**slika 8**), kao i smešom toksina (AA1 i OTA) (**slika 9**). Smanjenje ćelijske vijabilnosti bilo je proporcijalno koncentraciji i dužini izlaganja HK2 toksinima u svim eksperimentalnim grupama.



Slika 7. MTT test: vijabilnost HK2 ćelija nakon izlaganja OTA toksinu – vijabilnost ćelija se smanjuje proporcijalno većoj primenjenoj dozi i dužem vremenskom periodu



Slika 8. MTT test: vijabilnost HK2 ćelija nakon izlaganja AA1 toksinu – vijabilnost ćelija se smanjuje proporcijalno većoj primenjenoj dozi i dužem vremenskom periodu



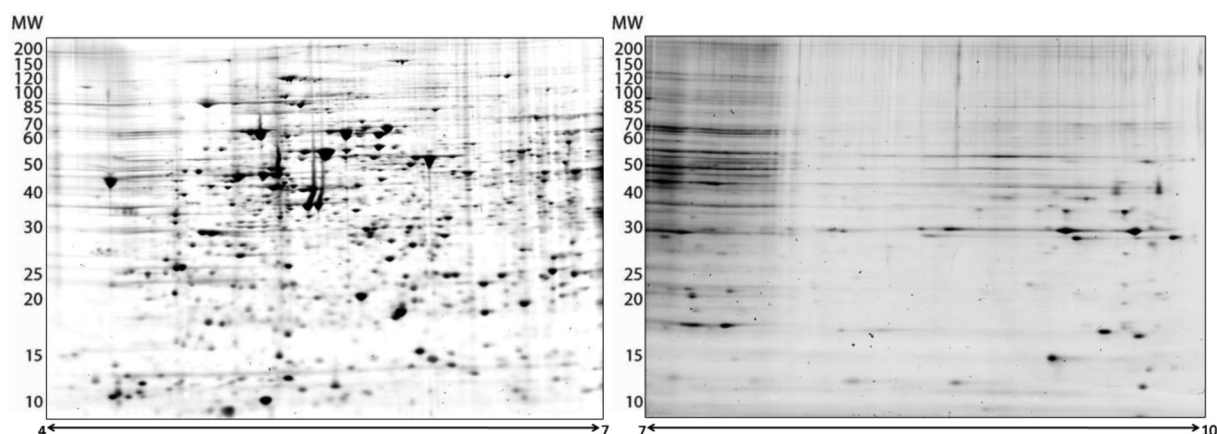
Slika 9. MTT test: vijabilnost HK2 ćelija nakon izlaganja AA1 toksinu – vijabilnost ćelija se smanjuje proporcijalno većoj primenjenoj dozi i dužem vremenskom periodu

4.9 Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina koji učestvuju u akutnom ćelijskom odgovoru na dejstvo toksina

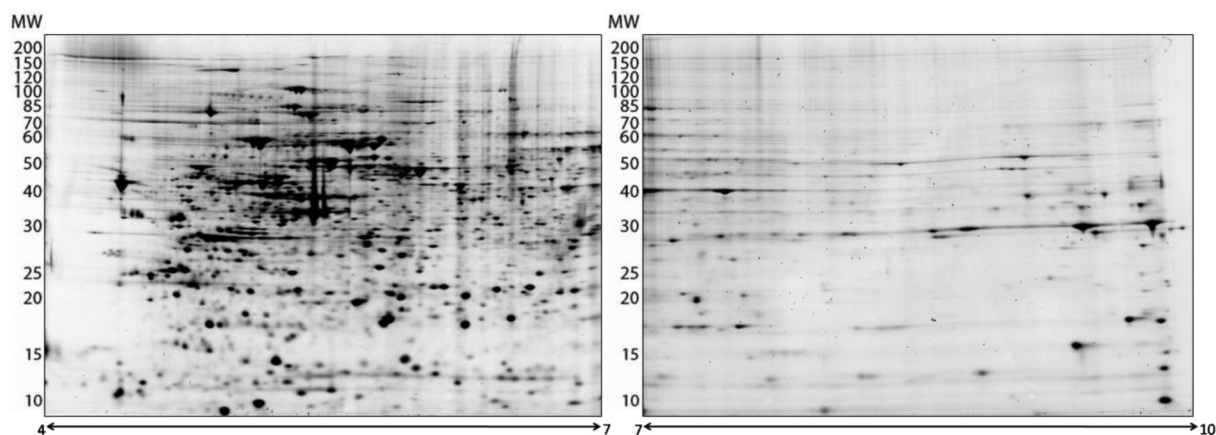
Akutna oštećenja HK2 ćelija nastala su nakon 72h inkubacije sa AA1, OTA, i kombinovanim tretmanom AA1 i OTA. Ćelije su kultivisane u medijumu bez seruma, da bi se izbegao uticaj interakcije toksina sa proteinima plazme na ishod eksperimenta. Nakon 72-časovne inkubacije, ćelije su sakupljene (uz pomoć tripsina) i tri puta ispirane PBS rastvorom. Na osnovu vrednosti MTT eseja, u eksperimentu su korišćene sledeće koncentracije toksina:

- I grupa: 2 $\mu\text{g/mL}$ OTA
- II grupa: 5 $\mu\text{g/mL}$ AA1
- III grupa: 5 $\mu\text{g/mL}$ AA1 i 2 $\mu\text{g/mL}$ OTA

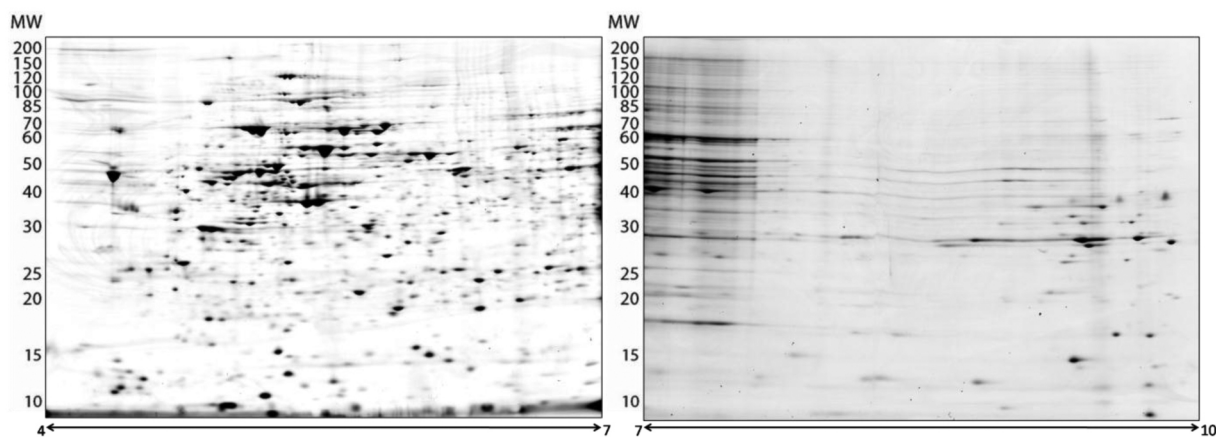
Ćelije su kolektovane i ekstrakti su korišćeni za dalja proteomska istraživanja. Da bi kreirali proteomske mape tretiranih ćelija, koristili smo 2-DE analizu ekstrakta (pI 4-7 i pI 7-10, **Slike 10-13**). Identifikacija specifičnih proteina obavljena je upotrebom masene spektrometrije i pretragom baze podataka (**Tabela 5, Slike 14-17**). Proteinski profili su bili značajno reproducibilni i nisu otkrivene značajne razlike nakon trostrukog ponavljanja mapiranja proteoma.



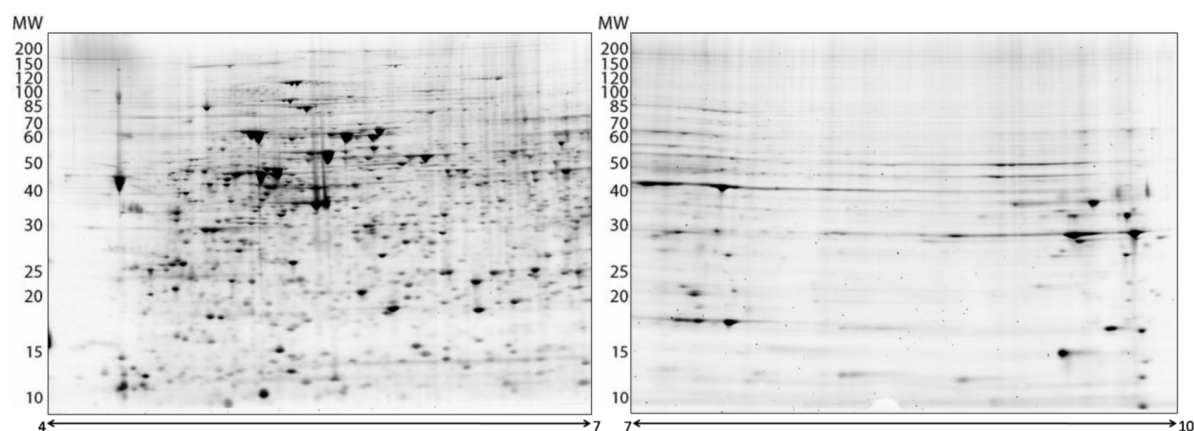
Slika 10. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 72h u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.



Slika 11. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 72h u medijumu bez seruma i sa 2 $\mu\text{g/mL}$ OTA. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.



Slika 12. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 72h u medijumu bez seruma i sa 5 $\mu\text{g/mL}$ AA1. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.



Slika 13. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 72h u medijumu bez seruma i sa 5 $\mu\text{g/mL}$ AA1 i 2 $\mu\text{g/mL}$ OTA. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.

Tabela 5. Lista proteina HK2 ćelija identifikovana masenom spektrometrijom i pretragom baza podataka. Ulazni broj u Swiss-Prot i NCBI je dat za svaki protein. Informacije i peptidnom masenom fingerprintu (PMF), o nominalnoj masi i vrednosti izoelektričnih tačaka za svaki protein su takođe navedene. 1-94 proteini značajno su eksprimirani u HK2 ćelijama kultivisanim u medijumu bez seruma; 95-150 i 235-244 proteini su značajno eksprimirani u HK2 ćelijama tretiranim AA1-om; 151-206 i 245-262 proteini su značajno eksprimirani u HK2 ćelijama tretiranim OTA-om; 207-219 i 263-300 proteini su značajno eksprimirani u HK2 ćelijama tretiranim AA1 i OTA-om (poređenje i ispitivanje razlika u ekspresiji proteina između različitih eksperimentalnih grupa urađeni su u Delta 2D programu). Proteini su razdvajani u pI 4-7 i pI 7-10 rangu.

No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
1	Mali ubiquitin-sličan modifikator 2	SUMO2	P61956	SUMO2_HUMAN	10864	5,32	199	7(3)
2	Tioredoxin	TXN	P10599	THIO_HUMAN	11730	4,82	163	4(3)
3	Koaktozin-like protein	COTL1	Q14019	COTL1_HUMAN	15935	5,54	59	6(2)
4	Miozin laki polipeptid 6	MYL6	P60660	MYL6_HUMAN	16919	4,56	30	2(1)
5	60S kiselo ribozomalni protein P2	RPLP2	P05386	RLA1_HUMAN	11658	4,42	78	2(2)
6	Miozin laki polipeptid 6	MYL6	P60660	MYL6_HUMAN	16919	4,56	95	5(2)
7	Delta podjedinica ATP sintaze	ATP5D	P30049	ARPD_HUMAN	17479	5,38	166	3(3)
8	Nukleofosmin	NPM1	P06748	NPM_HUMAN	32555	4,77	148	1(1)
9	39S ribozomalni protein L12	MRPL12	P52815	RM12_HUMAN	21335	5,01	113	5(3)
10	Klatrin laki lanac A	CLTA	P09496	CLCA_HUMAN	27060	4,43	105	6(2)
11	Nascentni polipeptidno-asociran kompleks podjedinica alfa	NACA	Q13765	NACA_HUMAN	23370	4,52	351	6(4)
12	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	P62258	1433E_HUMAN	29155	4,63	179	5(3)
14	Hepatoma-derived faktor rasta	HDGF	P51858	HDGF_HUMAN	26772	4,70	60	5(2)
15	Alfa-amilaza 1	AMY1A	P04745	AMY1_HUMAN	57731	6,47	543	21(13)
16	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	267	14(6)
17	Tubulin alfa-1A lanac	TUBA1A	Q71U36	TBA1A_HUMAN	50104	4,94	41	1(1)
18	UV ekscizioni reparacioni protein RAD23 homolog B	RAD23B	P54727	RD23B_HUMAN	43145	4,76	166	7(5)
19	Kalumenin	CALU	O43852	CALU_HUMAN	37084	4,47	117	6(3)
20	Ubikvilin-1	UBQLN1	Q9UMX0	UBQL1_HUMAN	62479	5,02	45	4(1)
21	Endoplazmin	HSP90B1	P14625	ENPL_HUMAN	92411	4,76	284	22(13)
22	Endoplazmin	HSP90B1	P14625	ENPL_HUMAN	92411	4,76	117	11(5)
23	Laminin podjedinica gama-1	LAMC1	P11047	LAMC1_HUMAN	177489	5,01	39	8(2)
24	Hipoksijom ushodno regulisani protein 1	HYOU1	Q9Y4L1	HYOU1_HUMAN	111266	5,16	350	24(12)
25	Kinektin	KTN1	Q86UP2	KTN1_HUMAN	156179	5,52	106	11(5)
26	Kinektin	KTN2	Q86UP2	KTN1_HUMAN	156179	5,52	72	9(3)
27	Rani endozom antigen 1	EEA1	Q15075	EEA1_HUMAN	162367	5,55	202	16(6)
28	Glavni valutni protein	MVP	Q14764	MVP_HUMAN	99266	5,34	135	9(4)
29	Miozin-9	MYH9	P35579	MYH9_HUMAN	226392	5,50	47	3(1)
30	Prelazni endoplazmatski retikulum ATP-aza	VCP	P55072	TERA_HUMAN	89266	5,14	361	16(10)
31	78 kDa glukozo-regulisani protein	HSPA5	P11021	GRP78_HUMAN	72288	5,07	885	21(18)
32	Lamin-B1	LMNB1	P20700	LMNB1_HUMAN	66368	5,11	242	12(8)
33	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	48	2(1)
34	Tubulin beta lanac	TUBB	P07437	TBB5_HUMAN	49639	4,78	481	17(15)
35	Podjedinica beta ATP sintaze, mitohondrijalna	ATP5B	P06576	ATPB_HUMAN	56525	5,26	190	7(5)
36	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	385	19(10)

No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
37	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	772	31(19)
38	Tubulin alfa-1B lanac	TUBA1B	P68363	TBA1B_HUMAN	50120	4,94	245	13(6)
39	NSFL1 kofaktor p47	NSFL1C	Q9UNZ2	NSF1C_HUMAN	40548	4,99	172	7(5)
40	Regulatorna podjedinica 6B 26S proteaze	PSMC4	P43686	PRS6B_HUMAN	47337	5,09	199	10(6)
41	Regulatorna podjedinica 6A 26S proteaze	PSMC3	P17980	PRS6A_HUMAN	49172	5,09	367	15(7)
42	Perilipin-3	PLIN3	O60664	PLIN3_HUMAN	47018	5,30	359	8(7)
43	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	148	7(4)
44	Sukcnil-CoA ligaza [GDP-formirajuća] podjedinica beta, mitohondrijalna	SUCLG2	Q96199	SUCB2_HUMAN	46481	6,15	166	7(5)
45	NSFL1 kofaktor p47	NSFL1C	Q9UNZ2	NSF1C_HUMAN	40548	4,99	147	5(3)
46	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	186	10(5)
47	Proteinska disulfid-isomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	336	16(11)
48	UBX domen-sadržujući protein 1	UBXN1	Q04323	UBXN1_HUMAN	33305	5,23	146	5(3)
49	Proteinska disulfid-isomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	49	5(1)
50	Aneksin A5	ANXA5	P08758	ANXA5_HUMAN	35914	4,94	500	16(10)
51	Proteazomska podjedinica alfa tip-3	PSMA3	P25788	PSA3_HUMAN	28415	5,19	71	2(1)
52	Hloridni intracelularni kanalski protein 1	CLIC1	O00299	CLIC1_HUMAN	26906	5,09	178	12(6)
53	Heat shock kognat 71 kDa protein	HSPA8	P11142	HSP7C_HUMAN	70854	5,37	280	8(5)
54	Sress-70 protein, mitohondrijalni	HSPA9	P38646	GRP75_HUMAN	73635	5,87	162	8(4)
55	NADH-ubikvinon oksidoreduktaza 75 kDa podjedinica, mitohondrijalna	NDUFS1	P28331	NDUS1_HUMAN	79417	5,89	193	11(6)
56	T-kompleks protein 1 podjedinica epsilon	CCT5	P48643	TCPE_HUMAN	59633	5,45	140	6(3)
57	60 kDa heat shock protein, mitohondrijalni	HSPD1	P10809	CH60_HUMAN	61016	5,70	987	28(22)
58	61 kDa heat shock protein, mitohondrijalni	HSPD2	P10809	CH60_HUMAN	61016	5,70	439	17(12)
59	Dihidrolipoilizin -residualna acetiltransferazna komponenta piruvat dehidrogenaznog kompleksa, mitohondrijalna forma	DLAT	P10515	ODP2_HUMAN	68953	7,06	154	8(4)
60	Kopin-1	CPNE1	Q99829	CPNE1_HUMAN	59022	5,52	119	9(5)
61	Protein disulfidna-isomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	1023	31(25)
62	Protein disulfidna-isomeraza A3	PDIA3	P30101	PDIA3_HUMAN	56747	5,98	53	5(1)
63	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	107	6(3)
64	Aktinu sličan protein 6A	ACTL6A	O96019	ACL6A_HUMAN	47430	5,39	94	6(1)
65	Nuklearni migratorni protein nudC	NUDC	Q9Y266	NUDC_HUMAN	38219	5,27	49	4(1)
66	Citohrom b-c1 complex podjedinica 1, mitohondrijalna	UQCRC1	P31930	QCR1_HUMAN	52612	5,94	199	14(5)
67	Stomatinu sličan protein 2	STOML2	Q9UJZ1	STML2_HUMAN	38510	6,88	455	10(5)
68	Endofilin-B1	SH3GLB1	Q9Y371	SHLB1_HUMAN	40771	5,78	121	6(4)
69	Statmin	STMN1	P16949	STMN1_HUMAN	17292	5,76	124	5(4)
70	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein H2	HNRNPH2	P55795	HNRN2_HUMAN	49232	5,89	250	6(5)
71	T-kompleks protein 1 podjedinica alfa	TCP1	P17987	TCPA_HUMAN	60306	5,80	185	9(6)

No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
72	Gelsolin	GSN	P06396	GELS_HUMAN	85644	5,90	87	4(3)
73	Kalponin-3	CNN3	Q15417	CNN3_HUMAN	36391	5,69	163	8(5)
74	Nikotidat-nukleotidna pirofosforilaza	QPRT	Q15274	NADC_HUMAN	30826	5,81	227	7(6)
75	Aneksin A3	ANXA3	P12429	ANXA3_HUMAN	36353	5,63	302	10(7)
76	Piruvat dehidrogenaza E1 komponenta podjedinica beta, mitohondrijalna	PDHB	P11177	ODPB_HUMAN	39208	6,20	317	10(7)
77	Guanine nukleotid-vezujući protein G (I)\G (S)\ G(T)	GNB1	P62873	GBB1_HUMAN	37353	5,60	137	6(3)
78	Neorganska pirofosfataza	PPA1	Q15181	IPYR_HUMAN	32639	5,54	209	5(5)
79	Peroksiredoksin-4	PRDX4	Q13162	PRDX4_HUMAN	30521	5,86	189	10(7)
80	Peroksiredoksin -2	PRDX2	P32119	PRDX2_HUMAN	21878	5,66	260	9(8)
81	Stahmin	STMN1	P16949	STMN1_HUMAN	17292	5,76	154	5(4)
82	BAG familija molekularni regulator šaperona 2	BAG2	O95816	BAG2_HUMAN	23757	6,25	223	7(5)
83	Triosefosfat izomeraza	TPI1	P60174	TPIS_HUMAN	26653	6,45	188	5(3)
84	Proteazomska podjedinica alfa tip-1	PSMA1	P25786	PSA1_HUMAN	29537	6,15	193	10(7)
85	Delta (3,5)-Delta (2,4)-dienoil-CoA izomeraza, mitohondrijalna	ECH1	Q13011	ECH1_HUMAN	35793	8,16	304	9(7)
86	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A\B	HNRNPAB	Q99729	ROAA_HUMAN	36202	8,22	120	4(3)
87	Protein 2G4 povezan sa proliferacijom	PA2G4	Q9UQ80	PA2G4_HUMAN	43759	6,13	207	9(7)
88	Alfa-enolaza	ENO1	P06733	ENOA_HUMAN	47139	7,01	145	11(7)
89	Sukcinil-CoA: 3-ketoacid-koenzim A transferaza 1, mitohondrijalna	OXCT1	P55809	SCOT1_HUMAN	56122	7,14	239	8(5)
90	T-kompleks protein 1 podjedinica beta	CCT2	P78371	TCPB_HUMAN	57452	6,01	72	4(1)
91	Aldehid dehidrogenaza X, mitohondrijalna	ALDH1B1	P30837	AL1B1_HUMAN	57202	6,36	527	15(11)
92	Ezrin	EZR	P15311	EZRI_HUMAN	69370	5,94	164	19(7)
93	Endoplazmiski retikulum rezidentni protein 29	ERP29	P30040	ERP29_HUMAN	28975	6,77	428	14(10)
94	RuvB-sličan protein 1	RUVBL1	Q9Y265	RUVB1_HUMAN	50196	6,02	420	14(10)
95	Glukozidaza 2 podjedinica beta	PRKCSH	P14314	GLU2B_HUMAN	59388	4,33	281	15(5)
96	Kalretikulin	CALR	P27797	CALR_HUMAN	48112	4,29	91	8(3)
97	Kalretikulin	CALR	P27797	CALR_HUMAN	48112	4,29	471	25(11)
98	Miozinski laki polipeptid 6	MYL6	P60660	MYL6_HUMAN	16919	4,56	318	13(9)
99	Tioredoksin	TXN	P10599	THIO_HUMAN	11730	4,82	178	9(2)
100	Protein S100-A6	S100A6	P06703	S10A6_HUMAN	10173	5,33	125	7(3)
101	Ubikvitin-40S ribozomalni protein S27a	RPS27A	P62979	RS27A_HUMAN	17953	9,68	309	16(7)
102	Protein S100-A11	S100A11	P31949	S10AB_HUMAN	11733	6,56	232	6(5)
103	U6 snRNA-povezana Sm-u sličan protein LSM2	LSM2	Q9Y333	LSM2_HUMAN	10828	6,04	120	5(2)
104	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	809	31(20)
105	Nukleofosmin	NPM1	P06748	NPM_HUMAN	32555	4,64	462	16(9)
106	Tropomiosin alfa-1 lanac	TPM1	P09493	TPM1_HUMAN	32689	4,69	111	14(4)
107	Hloridni intracelularni kanalski protein 1	CLIC1	O00299	CLIC1_HUMAN	26906	5,09	402	10(6)
108	Proteinska disulfid-isomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	201	14(4)
109	Proteinska disulfid-isomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	129	18(5)

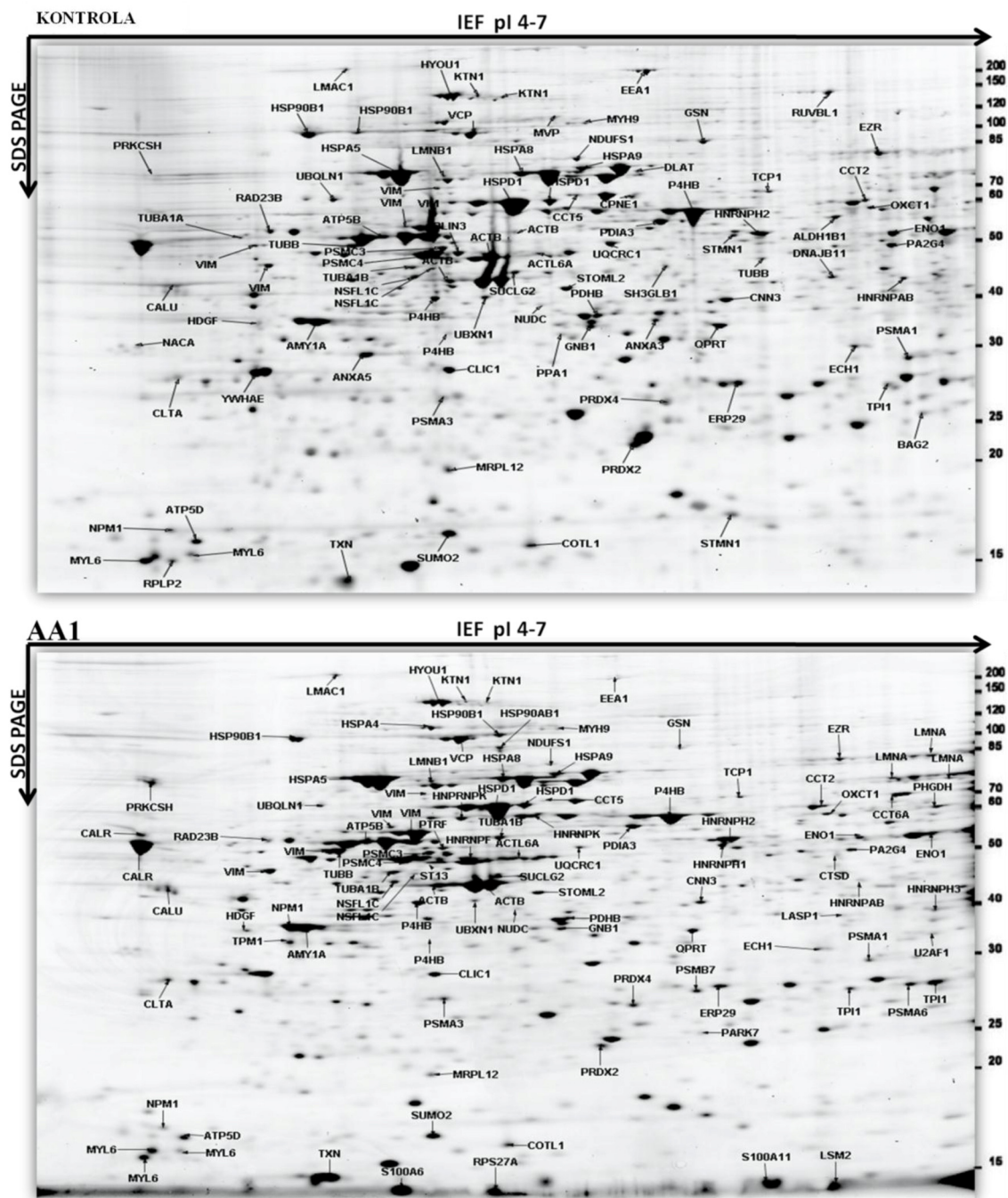
No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
110	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	457	17(10)
111	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	768	24(18)
112	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein F	HNRNPF	P52597	HNRPF_HUMAN	45643	5,38	616	17(11)
113	Polimeraza I i transkript oslobađajući factor	PTRF	Q6NZI2	PTRF_HUMAN	43450	5,51	112	16(3)
114	Regulatorna podjedinica 6A 26S proteaze	PSMC3	P17980	PRS6A_HUMAN	49172	5,13	230	23(7)
115	Tubulin alfa-1B lanac	TUBA1B	P68363	TBA1B_HUMAN	50120	4,94	300	20(10)
116	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K	HNRNPK	P61978	HNRPK_HUMAN	50944	5,39	840	25(21)
117	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K	HNRNPK	P61978	HNRPK_HUMAN	50944	5,39	327	11(9)
118	Lamin-B1	LMNB1	P20700	LMNB1_HUMAN	66368	5,11	405	30(11)
119	Lamin-B1	LMNB1	P20700	LMNB1_HUMAN	66368	5,11	357	27(12)
120	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	55	10(2)
121	Hsc70-interagujući protein	ST13	P50502	F10A1_HUMAN	41305	5,18	379	14(10)
122	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	556	28(17)
123	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	289	17(10)
124	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	502	29(18)
125	78 kDa glukozom regulisani protein	HSPA5	P11021	GRP78_HUMAN	72288	5,07	675	23(17)
126	Heat shock 70 kDa protein 4	HSPA4	P34932	HSP74_HUMAN	94271	5,11	254	23(6)
127	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	P08238	HS90B_HUMAN	83212	4,97	340	29(10)
128	Endoplazmin	HSP90B1	P14625	ENPL_HUMAN	92411	4,76	200	38(10)
129	Gelsolin	GSN	P06396	GELS_HUMAN	85644	5,90	89	14(2)
130	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein H	HNRNPH1	P31943	HNRH1_HUMAN	49198	5,89	424	17(9)
131	Proteazom podjedinica beta tip-7	PSMB7	Q99436	PSB7_HUMAN	29946	7,57	71	9(4)
132	Protein DJ-1	PARK7	Q99497	PARK7_HUMAN	19878	6,33	76	9(2)
133	Triozefosfat izomeraza	TPI1	P60174	TPIS_HUMAN	26653	6,45	422	16(10)
134	Delta (3,5)-Delta (2,4)-dienoil-CoA izomeraza, mitohondrijalna	ECH1	Q13011	ECH1_HUMAN	35793	8,16	226	12(6)
135	LIM i SH3 domen 1	LASP1	Q14847	LASP1_HUMAN	29698	6,61	181	16(7)
136	Proteazomska podjedinica alfa tip-6	PSMA6	P60900	PSA6_HUMAN	27382	6,34	351	15(8)
137	Triozefosfat izomeraza	TPI1	P60174	TPIS_HUMAN	26653	6,45	472	7(5)
138	Splajsing faktor U2AF 35 kDa podjedinica	U2AF1	Q01081	U2AF1_HUMAN	27854	9,09	159	3(2)
139	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein H3	HNRNPH3	P31942	HNRH3_HUMAN	36903	5,89	592	17(12)
140	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A\B	HNRNPAB	Q99729	ROAA_HUMAN	36202	8,22	85	8(4)
141	Katepsin D	CTSD	P07339	CATD_HUMAN	44524	6,10	56	15(1)
142	Alfa-enolaza	ENO1	P06733	ENOA_HUMAN	47139	7,01	531	26(13)
143	D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza	PHGDH	O43175	SERA_HUMAN	56614	6,29	425	20(10)
144	Lamin-A\C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	235	29(9)
145	T-kompleks protein 1 podjedinica zeta	CCT6A	P40227	TCPZ_HUMAN	57988	6,23	377	29(11)
146	Lamin-A\C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	55	8(3)
147	Lamin-A\C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	254	18(11)

No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvenca
148	Lamin-A\C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	367	27(11)
149	Lamin-A\C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	310	26(11)
151	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	80	12(4)
152	Eukariotski translacioni inicijacioni faktor 5A-1	EIF5A	P63241	IF5A1_HUMAN	16821	5,08	33	2(1)
153	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	226	11(6)
154	Eukariotski translacioni inicijacioni faktor 5A-1	EIF5A	P63241	IF5A1_HUMAN	16821	5,08	64	5(2)
155	14-3-3 protein gama	YWHAG	P61981	1433G_HUMAN	28285	4,80	131	11(5)
156	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	P62259	1433E_HUMAN	29155	4,63	341	18(8)
157	Proteinska disulfidna-izomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	135	12(5)
158	Tioredotsinu sličan protein 1	TXNL1	O43396	TXNL1_HUMAN	32231	4,84	97	13(5)
159	Splajsing faktor, arginin-serin-bogat protein 1	SFRS1	Q07955	SFRS1_HUMAN	27728	10,37	438	22(12)
160	Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	HSPB1_HUMAN	22768	5,98	174	14(3)
162	Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	HSPB1_HUMAN	22768	5,98	136	11(3)
163	Ubikvitinom konjugovani enzim E2	UBE2N	P61088	UBE2N_HUMAN	17127	6,13	117	8(3)
164	Histon H2B tip 1-C/E\F\G\I	HIST1H2BC	P62807	H2B1C_HUMAN	13898	10,31	115	11(2)
165	Histon H2B tip 1-C/E\F\G\I	HIST1H2BC	P62807	H2B1C_HUMAN	13898	10,31	235	6(5)
167	Tioredotsin-zavisna peroksid reduktaza, mitohondrijalna	PRDX3	P30048	PRDX3_HUMAN	27675	7,67	213	5(4)
168	Protein-L-izoaspartat (D-aspartat) O-metiltransferaza	PCMT1	P22061	PIMT_HUMAN	24635	6,70	213	8(6)
169	Triozefosfat izomeraza	TPI1	P60174	TPIS_HUMAN	26653	6,45	395	18(8)
171	Aldoza reduktaza	AKR1B1	P15121	ALDR_HUMAN	35830	6,51	141	7(5)
172	Stres-indukovani-fosfoprotein 1	STIP1	P31948	STIP1_HUMAN	62599	6,20	97	6(3)
174	Ezrin	EZR	P15311	EZRI_HUMAN	69370	5,94	74	9(1)
176	Ziksin	ZYX	Q15942	ZYX_HUMAN	61238	6,22	56	3(1)
177	Mitohondrijalni unutrašnji membranski protein	IMMT	Q16891	IMMT_HUMAN	83626	6,08	54	6(1)
178	T-kompleks protein 1 podjedinica beta	CCT2	P78371	TCPB_HUMAN	57452	6,56	71	8(2)
179	Triptofanil-tRNA sintetaza, citoplazmatska	WARS	P23381	SYWC_HUMAN	53132	5,83	86	8(3)
180	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A\B	HNRNPAB	Q99729	ROAA_HUMAN	36202	8,22	100	6(3)
181	DnaJ homologna subfamilija B član 11	DNAJB11	Q9UBS4	DJB11_HUMAN	40489	5,81	108	10(4)
183	Tubulin beta lanac	TUBB	P07437	TBB5_HUMAN	49639	4,78	263	16(10)
184	Makrofag-vezujući protein	CAPG	P40121	CAPG_HUMAN	38494	5,88	201	6(3)
185	Tubulin beta lanac	TUBB	P07437	TBB5_HUMAN	49639	4,78	61	6(2)
188	Kopin-1	CPNE1	Q99829	CPNE1_HUMAN	59022	5,52	130	17(5)
189	Protein NDRG1	NDRG1	Q92597	NDRG1_HUMAN	42808	5,49	56	2(1)
190	Heat shock cognat 71 kDa protein	HSPA8	P11142	HSP7C_HUMAN	70854	5,37	274	21(7)
191	Laminin podjedinica gama-1	LAMC1	P11047	LAMC1_HUMAN	177489	5,01	226	19(7)
192	Ubikvitin-1	UBQLN1	Q9UMX0	UBQL1_HUMAN	62479	5,02	42	2(1)
193	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	547	19(14)
194	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	489	16(10)
195	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	81	7(1)

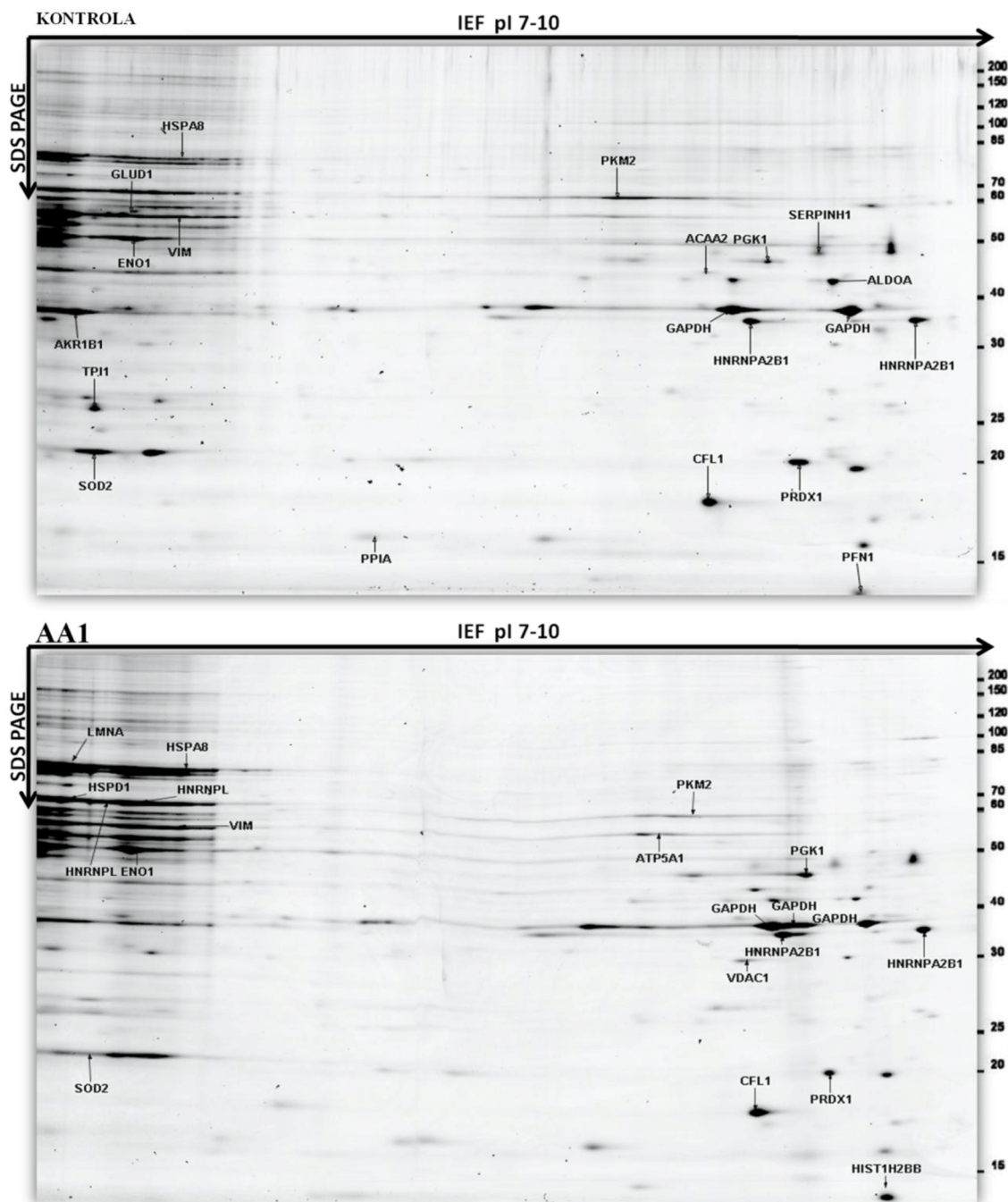
No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
196	Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini C1/C2	HNRNPC	P07910	HNRPC_HUMAN	33650	4,95	161	13(3)
197	Aktin, aortni glatki mišić	ACTA2	P62736	ACTA_HUMAN	41982	5,29	33	5(1)
198	Aktin, citoplazmatski 1	ACTB	P60709	ACTB_HUMAN	41710	5,29	361	12(8)
199 ^a	40S ribozomalni protein	RPSA	P08865	RSSA_HUMAN	32833	4,79	156	10(5)
199 ^b	Nukleofosmin	NPM1	P06748	NPM_HUMAN	32555	4,64	118	8(2)
200	Retikulokalbin-1	RCN1	Q15293	RCN1_HUMAN	38866	4,86	61	3(1)
202	Retikulokalbin-1	RCN1	Q15293	RCN1_HUMAN	38866	4,86	93	6(2)
203	Histon vezujući protein RBBP4	RBBP4	Q09028	RBBP4_HUMAN	47626	4,74	97	7(2)
204	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	81	17(3)
205	UV excizioni reparacioni protein RAD23 homolog B	RAD23B	P54727	RD23B_HUMAN	43145	4,76	121	3(3)
205	Endoplazmin	HSP90B1	P14625	ENPL_HUMAN	92411	4,76	51	6(2)
206	Proteinska disulfidna-izomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	526	27(22)
207	Kalumenin	CALU	O43852	CALU_HUMAN	37084	4,47	95	10(4)
208	Aktin, aortni glatki mišić	ACTA2	P62736	ACTA_HUMAN	41982	5,29	64	3(2)
209	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K	HNRNPK	P61978	HNRPK_HUMAN	50944	5,39	175	9(7)
210	Proteinska disulfidna-izomeraza A3	PDIA3	P30101	PDIA3_HUMAN	56747	5,98	535	25(15)
211	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein H2	HNRNPH2	P55795	HNRN2_HUMAN	49232	5,89	58	5(2)
212	Glutation S-transferaza P	GSTP1	P09211	GSTP1_HUMAN	23341	5,43	151	8(4)
212	Peroksiredoksin-2	PRDX2	P32119	PRDX2_HUMAN	21878	5,66	97	8(3)
214	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein H3	HNRNPH3	P31942	HNRH3_HUMAN	36903	5,89	249	14(7)
216	Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini C1/C2	HNRNPC	P07910	HNRPC_HUMAN	33650	4,95	148	17(7)
218	Triptofanil-tRNA sintetaza, citoplazmatska	WARS	P23381	SYWC_HUMAN	53132	5,83	53	2(1)
219	Tubulin beta-3 lanac	TUBB3	Q13509	TBB3_HUMAN	50400	4,83	114	14(4)
220	Triozefosfat izomeraza	TP11	P60174	TPIS_HUMAN	26653	6,45	90	7(5)
221	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	105	7(3)
222	Aldozoreduktaza	AKR1B1	P15121	ALDR_HUMAN	35830	6,51	43	6(1)
225	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	169	11(9)
226	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	141	9(5)
227	Fruktozo-bisfosfat aldolaza A	ALDOA	P04075	ALDOA_HUMAN	39395	8,30	48	4(2)
229	Serpin H1	SERPINH1	P50454	SERPH_HUMAN	46411	8,75	89	5(2)
230	Alfa-enolaza	ENO1	P06733	ENOA_HUMAN	47139	7,01	165	12(6)
233	Piruvat kinazni isoenzimi M1/M2	PKM2	P14618	KPYM_HUMAN	57900	7,96	31	8(0)
234	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	P22626	ROA2_HUMAN	37407	8,97	155	9(5)
235	Histon H2B tip 1-B	HIST1H2BB	P33778	H2B1B_HUMAN	13942	10,31	98	8(5)
236	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	210	9(7)
237	Fosfoglicerat kinaza 1	PGK1	P00558	PGK1_HUMAN	44586	8,30	55	9(2)
239	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	48	5(1)

No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
241	Alfa-enolaza	ENO1	P06733	ENOA_HUMAN	47139	7,01	152	16(5)
242	Piruvat kinazni isoenzimi M1/M2	PKM2	P14618	KPYM_HUMAN	57900	7,96	191	11(5)
243	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	200	16(9)
244	Kofilin-1	CFL1	P23528	COF1_HUMAN	18491	8,22	107	10(2)
245	Voltažno-zavisni anjon-selectivni kanalski protein 1	VDAC1	P21796	VDAC1_HUMAN	30754	8,62	232	14(7)
246	Malat dehidrogenaza, mitohondrijalna	MDH2	P40926	MDHM_HUMAN	35481	8,92	582	24(15)
247	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A1	HNRNPA1	P09651	ROA1_HUMAN	38723	9,17	612	26(18)
248	Piruvat kinazni isoenzimi M1/M2	PKM2	P14618	KPYM_HUMAN	57900	7,96	578	22(15)
249	ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	ATP5A1	P25705	ATPA_HUMAN	59714	9,16	329	23(10)
250	ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	ATP5A1	P25705	ATPA_HUMAN	59714	9,16	126	7(4)
251	Piruvat kinazni isoenzimi M1/M2	PKM2	P14618	KPYM_HUMAN	57900	7,96	253	14(8)
252	ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	ATP5A1	P25705	ATPA_HUMAN	59714	9,16	103	7(4)
253	78 kDa glukozo-regulisani protein	HSPA5	P11021	GRP78_HUMAN	72288	5,07	675	23(17)
254	Endoplasmin	HSP90B1	P14625	ENPL_HUMAN	92411	4,76	110	8(3)
255	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	252	13(4)
256	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	165	11(5)
257	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	28	3(0)
258	Tropomiozin alfa-1 lanac	TPM1	P09493	TPM1_HUMAN	32689	4,69	86	2(2)
259	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	64	9(2)
260	Protein S100-A10	S100A10	P60903	S10AA_HUMAN	11196	6,82	128	5(3)
261	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	258	8(7)
262	Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini A2/B1	HNRNPA2B1	P22626	ROA2_HUMAN	37407	8,97	100	6(3)
263	Malat dehidrogenaza, mitohondrijalna	MDH2	P40926	MDHM_HUMAN	35481	8,92	364	12(9)
264	Fruktozo-bisfosfat aldolaza A	ALDOA	P04075	ALDOA_HUMAN	39395	8,30	48	4(2)
265	Non-PU domen-sadržujući oktamer-vezujući protein	NONO	Q15233	NONO_HUMAN	54197	9,01	58	3(1)
266	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M	HNRNPM	P52272	HNRPM_HUMAN	77464	8,84	175	13(6)
267	Piruvat kinazni isoenzimi M1/M2	PKM2	P14618	KPYM_HUMAN	57900	7,96	243	11(9)
268	ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	ATP5A1	P25705	ATPA_HUMAN	59714	9,16	274	15(8)
269	ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	ATP5A1	P25705	ATPA_HUMAN	59714	9,16	274	15(8)
270	Fosfoglicerat kinaza 1	PGK1	P00558	PGK1_HUMAN	44586	8,30	676	18(11)
271	Fosfoglicerat kinaza 1	PGK1	P00558	PGK1_HUMAN	44586	8,30	472	18(10)
272	Voltažno-zavisni anjon-selectivni kanalski protein 1	VDAC1	P21796	VDAC1_HUMAN	30754	8,62	232	14(7)
273	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	183	10(3)
274	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	80	10(4)

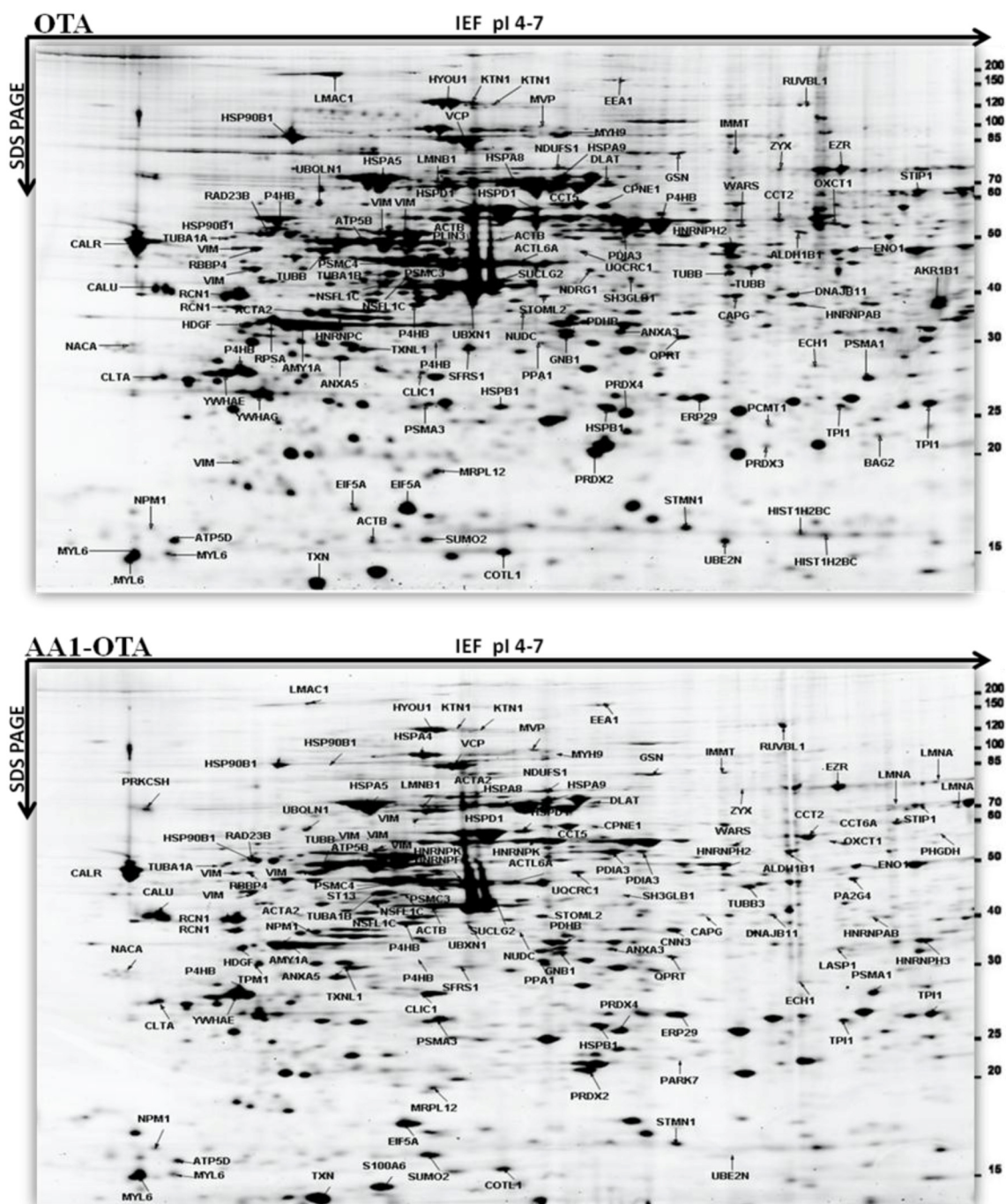
No	Naziv proteina	Genetički naziv	UniProtKB/Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Mass	CPI	PMF-scor	Pokrivenost PMF-sekvence
275	Aldoza reduktaza	AKR1B1	P15121	ALDR_HUMAN	35830	6,51	43	6(1)
276	F-aktin-vezujući protein podjedinica alfa-1	CAPZA1	P52907	CAZA1_HUMAN	32902	5,45	77	4(1)
277	Alfa-enolaza	ENO1	P06733	ENOA_HUMAN	47139	7,01	228	17(7)
278	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	83	11(3)
279	60 kDa heat shock protein, mitohondrijalni	HSPD1	P10809	CH60_HUMAN	61016	5,70	131	15(4)
279	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein L	HNRNPL	P14866	HNRPL_HUMAN	64092	8,46	37	8(1)
280	60 kDa heat shock protein, mitohondrijalni	HSPD1	P10809	CH60_HUMAN	61016	5,70	124	12(4)
281	Nukleolin	NCL	P19338	NUCL_HUMAN	76568	4,6	206	9(6)
281	Tranzicionalna endoplazmatski retikulum ATPaza	VCP	P55072	TERA_HUMAN	89266	5,14	51	5(2)
282	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein L	HNRNPL	P14866	HNRPL_HUMAN	64092	8,46	32	9(1)
283	Apoptoza-indukujući faktor 1, mitohondrijalni	AIFM1	O95831	AIFM1_HUMAN	66859	9,04	64	4(2)
284	Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini A2/B1	HNRNPA2B1	P22626	ROA2_HUMAN	37407	8,97	56	4(2)
285	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	187	12(6)
286	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	228	15(7)
287	26S proteaza regulatorna podjedinica 10B	PSMC6	P62333	PRS10_HUMAN	44145	7,1	66	7(3)
288	Poly (rC)-vezujući protein 1	PCBP1	Q15365	PCBP1_HUMAN	37474	6,66	116	7(2)
289	Glutamat dehidrogenaza 1, mitohondrijalna	GLUD1	P00367	DHE3_HUMAN	61359	7,66	29	8(0)
290	Prelamin-A/C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	88	9(3)
291	Prelamin-A/C	LMNA	P02545	LMNA_HUMAN	74095	6,57	135	9(4)
292	Heat shock cognat 71 kDa protein	HSPA8	P11142	HSP7C_HUMAN	70854	5,37	115	7(3)
293	Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini A2/B1	HNRNPA2B1	P22626	ROA2_HUMAN	37407	8,97	223	13(5)
294	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	299	20(11)
295	Voltažno-zavisni anjon-selektivni kanalski protein 1	VDAC1	P21796	VDAC1_HUMAN	30754	8,62	267	14(7)
296	Nukleozid difosfate kinaza B	NME2	P22392	NDKB_HUMAN	17287	8,52	44	8(2)
297	Piruvat kinaza izoenzimi M1/M2	PKM2	P14618	KPYM_HUMAN	57900	7,96	228	19(9)
298	ATP sintaza podjedinica alfa, mitohondrijalna	ATP5A1	P25705	ATPA_HUMAN	59714	9,16	366	18(12)
299	Fruktozo-bisfosfat aldolaza A	ALDOA	P04075	ALDOA_HUMAN	39395	8,30	271	15(9)
300	Serpin H1	SERPINH1	P50454	SERPH_HUMAN	46411	8,75	118	8(1)



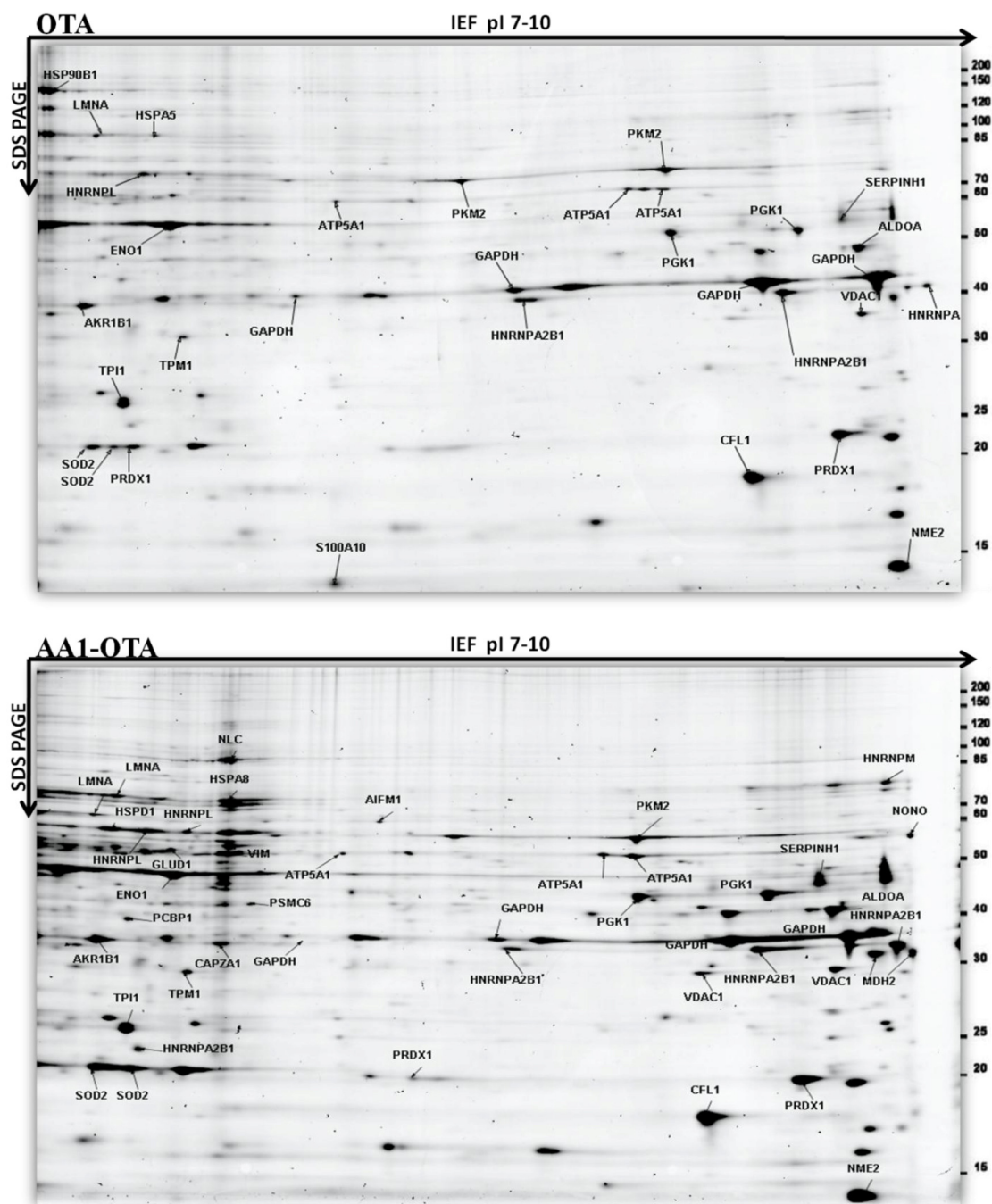
Slika 14. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija bez tretmana (gore) i HK2 ćelija tretiranih 72h 5 μ g/mL AA1 toksinom u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 4-7 rangu i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.



Slika 15. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija bez tretmana (gore) i HK2 ćelija tretiranih 72h 5 µg/mL AA1 toksinom u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 7-10 rangu i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.



Slika 16. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija tretiranih 72h 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OTA toksinom (gore) i HK2 ćelija tretiranih 72h 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AA1 i 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OTA toksinima u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 4-7 rangi i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.

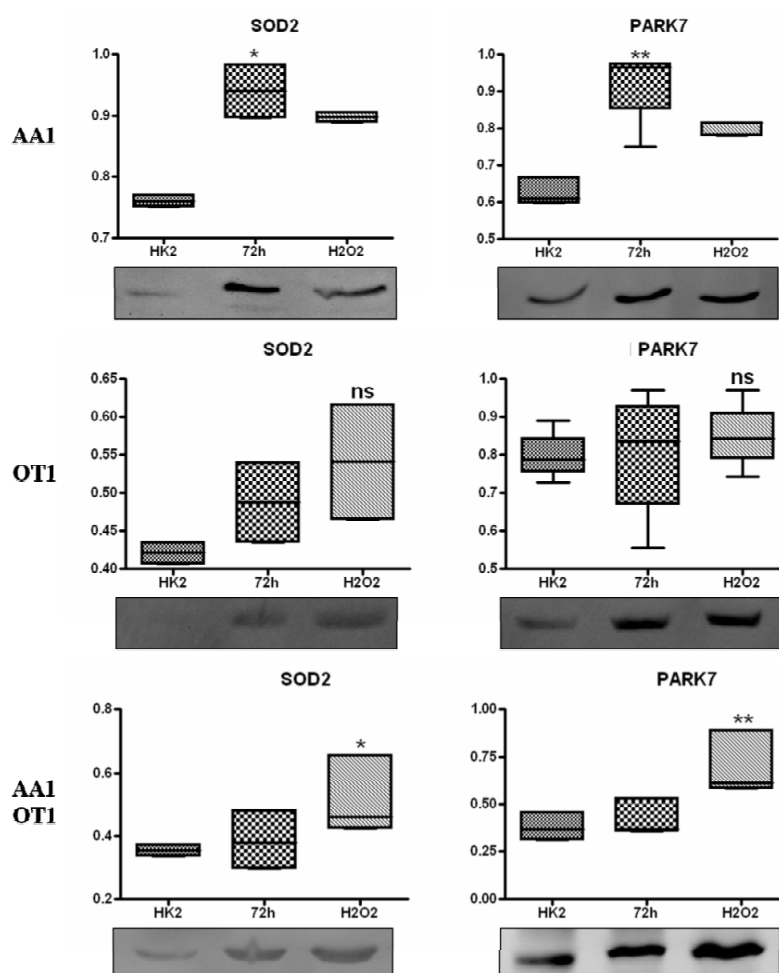


Slika 17. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija tretiranih 72h 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OTA toksinom (gore) i HK2 ćelija tretiranih 72h 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AA1 i 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OTA toksinima u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 7-10 rangi i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.

4.10 Imunološko potvrđivanje markera oksidativnog stresa u ćelijskim lizatima nakon akutnog izlaganja HK2 ćelija toksinima

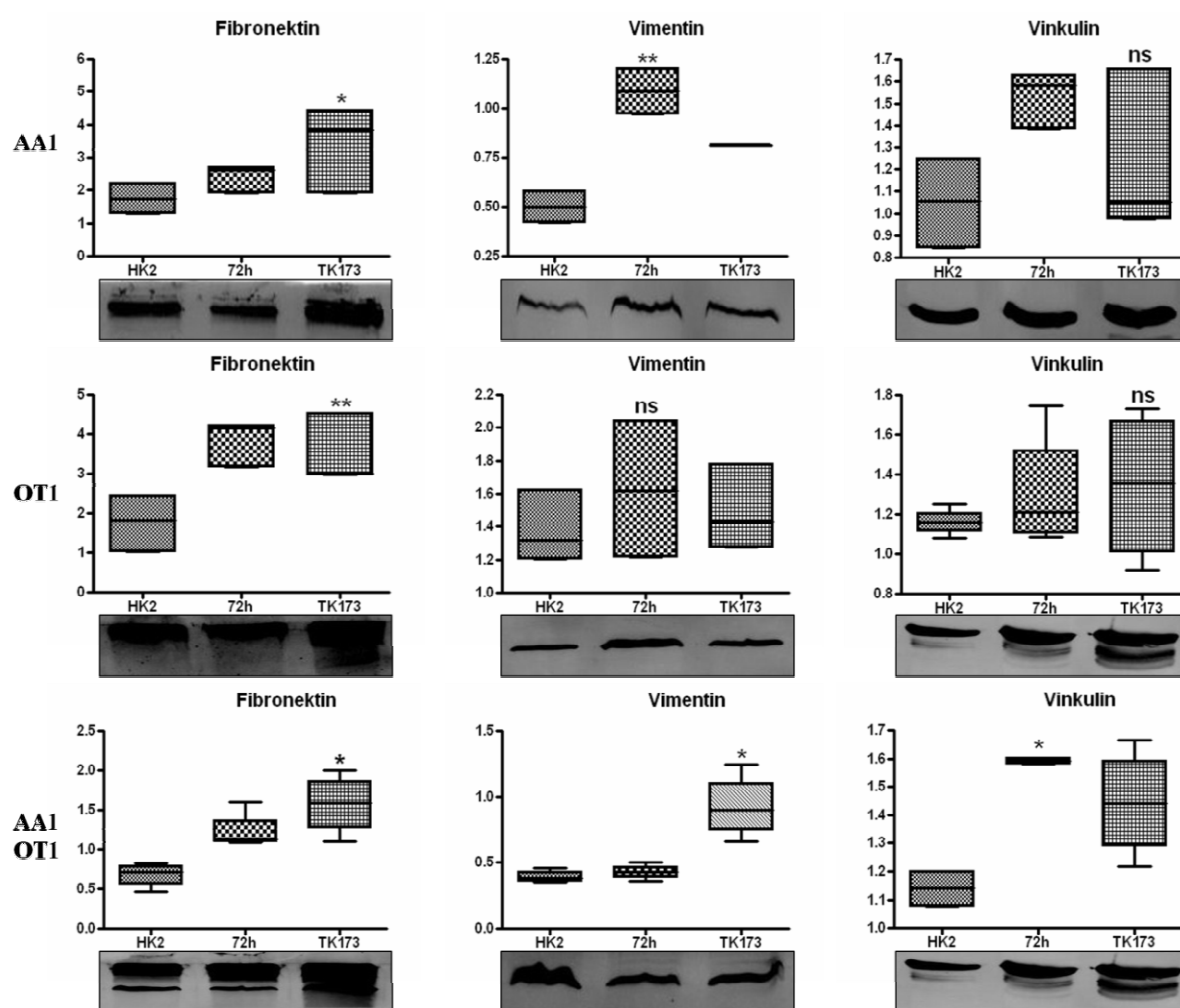
2-DE analiza uzoraka utvrdila je postojanje parametara oksidativnog stresa kao odgovor ćelije na prisustvo toksina u medijumu. Potvrda dobijenih 2-DE rezultata izvršena je Western blot analizom. Ispitivano je postojanje povišenog oksidativnog stresa u tretiranim ćelijama kao odgovor na dejstvo toksina upotrebom odgovarajućih antitela protiv superoksid dizmutaze 2 (SOD2) i proteina DJ-1 (PARK7). Kao pozitivna kontrolna grupa, korišćeni su lizati HK2 ćelija tretiranih 72h rastvorom vodonik peroksida (H_2O_2) i uzgajanih pod istim eksperimentalnim uslovima kao ostale ispitivane grupe [99].

Značajno povišene vrednosti ovih markera zabeležene su nakon ekspozicije HK2 ćelija AA1 toksinom, kao i tokom kombinovanog tretmana. OTA je takođe indukovao oksidativni stres, ali ne značajno (**Grafikon 7**).



Grafikon 7. Western blot analiza ekspresije proteina SOD2 i PARK7 kao markera oksidativnog stresa; podaci ističu postojanje razlike između ekspresije ovih proteina u lizatu HK2 bez tretmana u odnosu na lizate 72h toksinima tretiranih ćelija (AA1, OTA, AA1-OTA) i lizat HK2 tretiranih vodonik peroksidom.

Da bi ispitali efekte toksina na mogućnost fibrozne transformacije tubulocita, i potvrdili rezultate dobijene 2-DE analizom, analizirali smo i postojanje fibrotičnih markera u lizatima tretiranih ćelija (fibronektin, vimentin, vinkulin). Lizat TK173 ćelija, humanih fibroblasta, koristio je kao pozitivna kontrola (**Grafikon 8**). Fibronektin je bio značajno povišen u lizatima svih tretiranih ćelija, dok su značajno veće vrednosti vinkulina nađene kao posledica kombinovanog tretmana. Vimentin je bio značajno pojačano eksprimiran u HK2 ćelijama tretiranim AA1 i u kombinovanom tretmanu.



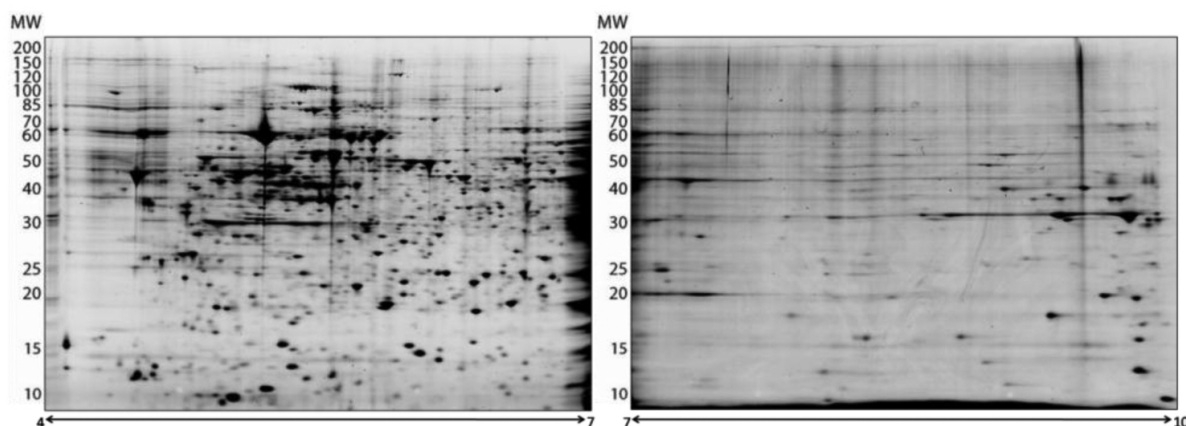
Grafikon 8. Western blot analiza ekspresije proteina fibronektina, vimentina i vinkulina kao markera fibroze; podaci ističu postojanje razlike između ekspresije ovih proteina u lizatu HK2 bez tretmana u odnosu na lizate 72h toksinima tretiranih ćelija (AA1, OTA, AA1-OTA) i lizat TK173 ćelija.

4.11 Kvantitativna i kvalitativna analiza proteina koji učestvuju u hroničnom ćelijskom odgovoru na dejstvo toksina

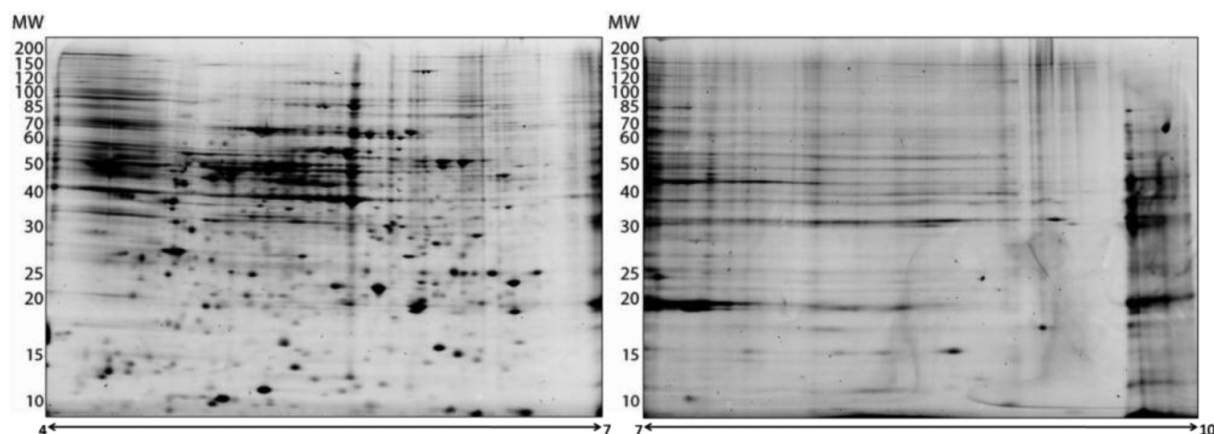
Hronična oštećenja HK2 ćelija nastala su nakon desetodnevne, jednomesečne i dvome-sečne inkubacije sa AA1, OTA, i kombinovanim tretmanom AA1 i OTA. Ćelije su kultivisane u medijumu bez seruma, da bi se izbegao uticaj interakcije toksina sa proteinima plazme na ishod eksperimenta. Nakon inkubacionog perioda, ćelije su sakupljene (uz pomoć tripsina) i tri puta ispirane PBS rastvorom. Na osnovu vrednosti MTT eseja, u eksperimentu su korišćene sledeće koncentracije toksina:

- I grupa: 0,5 ng/mL OTA
- II grupa: 0,5 µg/mL AA1
- III grupa: 0,5 µg/mL AA1 i 0,5 ng/mL OTA

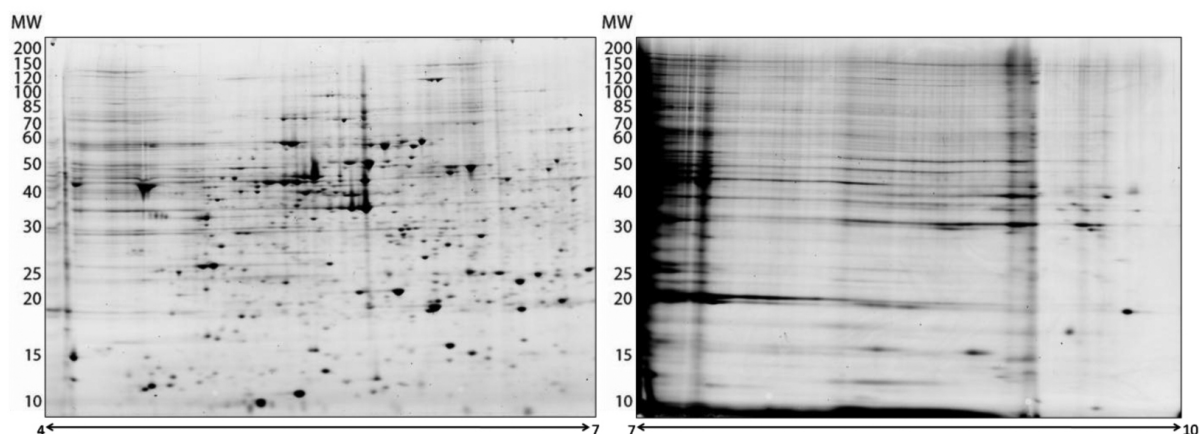
Ćelijski ekstrakti su dalje korišćeni u svrhe proteomskih istraživanja. Da bi kreirali proteomske mape tretiranih ćelija, koristili smo 2-DE analizu ekstrakta (pI 4-7 i pI 7-10, **Slike 18-21**). Identifikacija specifičnih proteina obavljena je upotrebom masene spektrometrije i pretragom baze podataka (**Tabela 6, Slike 22-25**). Proteinski profili su bili značajno reproducibilni i nisu otkrivene značajne razlike nakon trostrukog ponavljanja mapiranja proteoma.



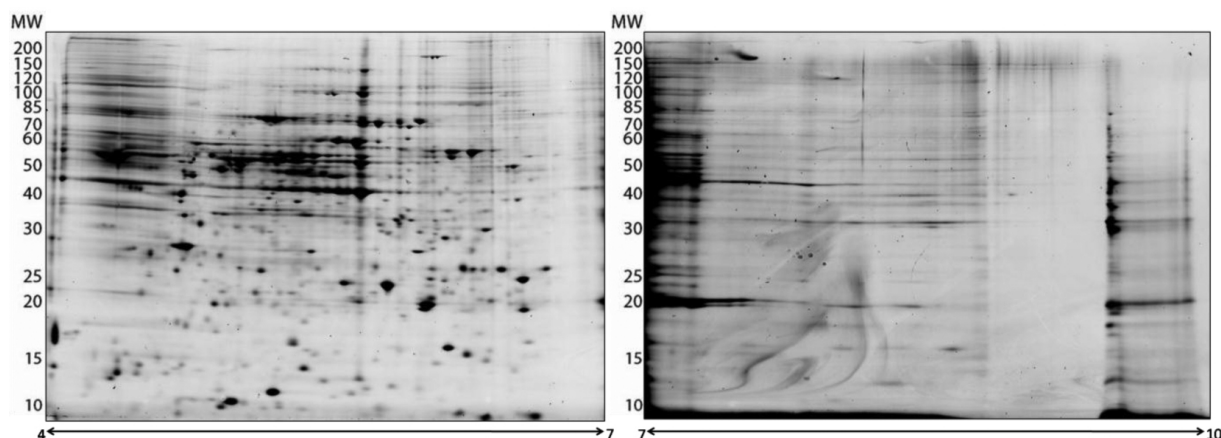
Slika 18. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 30 dana u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.



Slika 19. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 30 dana u medijumu bez seruma i sa 0,5 ng/mL OTA. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.



Slika 20. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 30 dana u medijumu bez seruma i sa 0,5 µg/mL AA1. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.

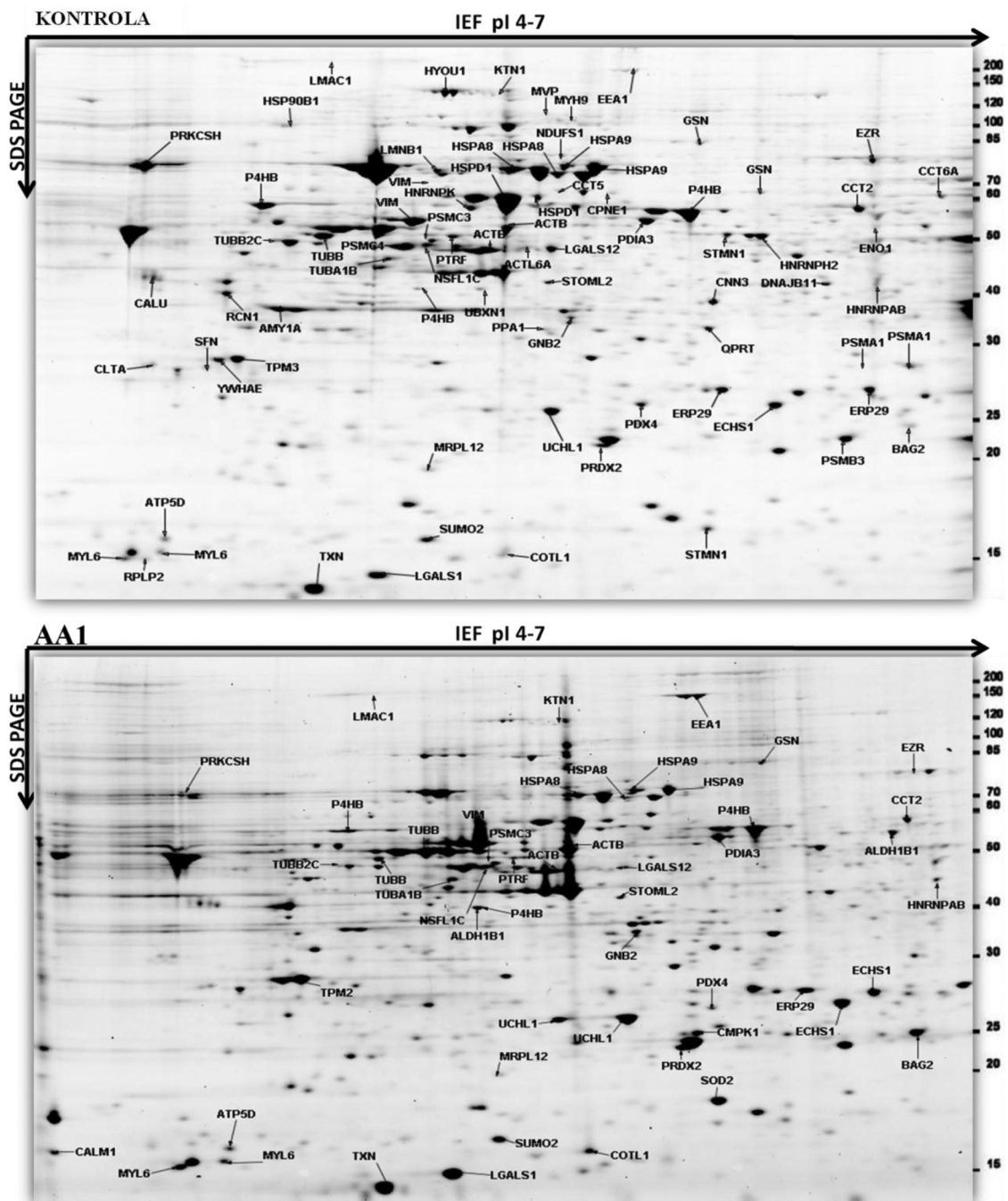


Slika 21. 2D slike proteoma HK2 ćelija kultivisanih 30 dana u medijumu bez seruma i sa 0,5 µg/mL AA1 i 0,5 ng/mL OTA. Proteini su razdvojeni duž pI 4-7 (slika levo) i pI 7-10 (slika desno) gradijenta i 12% SDS PAGE na osnovu njihove molekularne težine.

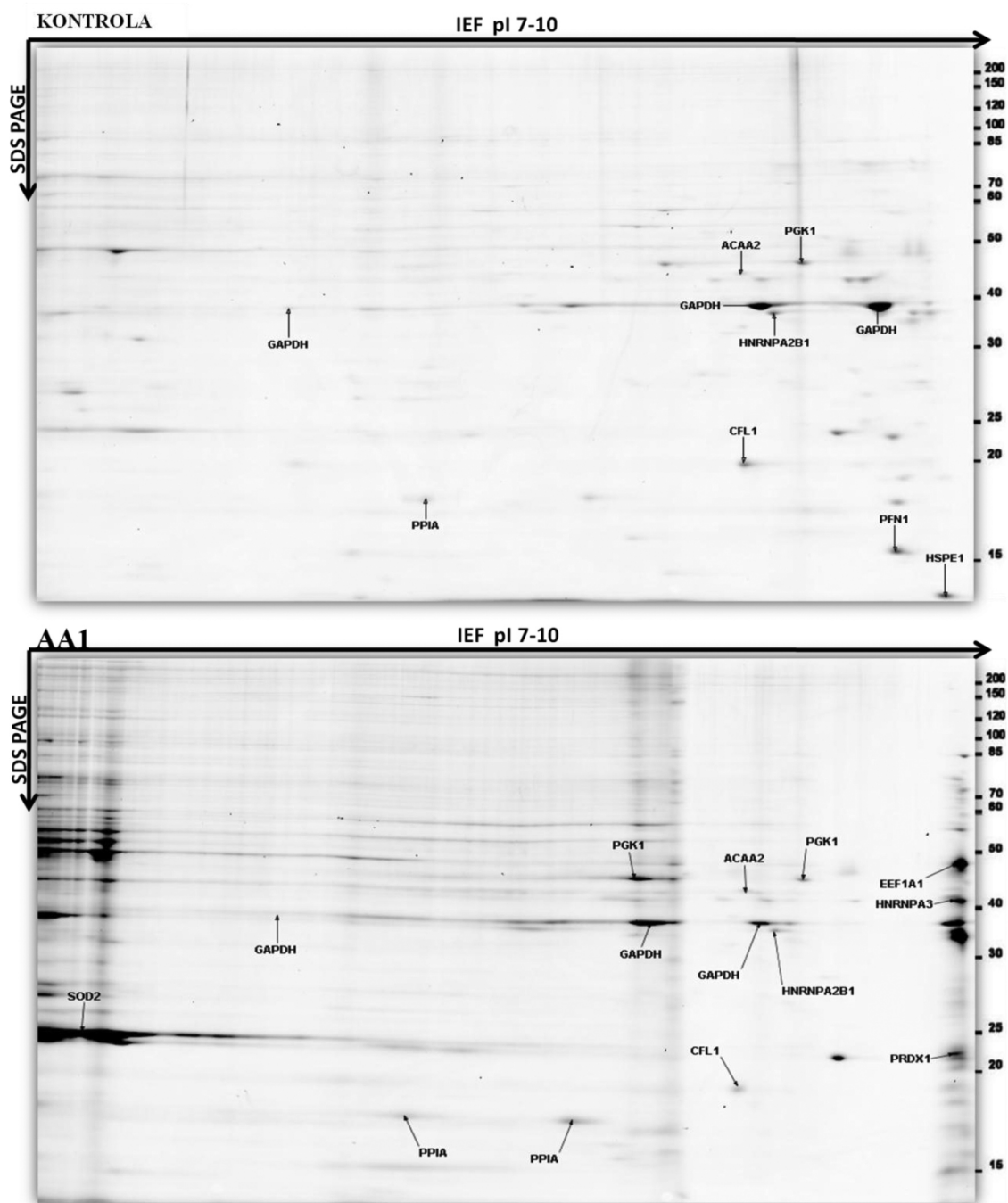
Tabela 6. Lista proteina HK2 ćelija identifikovana masenom spektrometrijom i pretragom baza podataka. Ulazni broj u Swiss-Prot i NCBI je dat za svaki protein. Informacije i peptidnom masenom fingerprintu (PMF), o nominalnoj masi i vrednosti izoelektričnih tačaka za svaki protein su takođe navedene. 10-20 i 47-75 proteini značajno su ekprimirani u HK2 ćelijama kultivisanim u medijumu bez seruma; 25-30 i 34-46 proteini su značajno ekprimirani u HK2 ćelijama tretiranim AA1-om; 1-9 i 21-24 proteini su značajno ekprimirani u HK2 ćelijama tretiranim OTA-om; 31-33 proteini su značajno ekprimirani u HK2 ćelijama tretiranim AA1 i OTA-om (poređenje i ispitivanje razlika u ekspresiji proteina između različitih eksperimentalnih grupa urađeni su u Delta 2D programu). Proteini su razdvajani u pI 4-7 i pI 7-10 rangu.

No	Ime proteina	Gensko ime	UniProtKB/ Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Masa	CPI	PMF-scor	PMF- pokrivenost sekvence
1	Miozin laki polipeptid 6	MYL6	P60660	MYL6_HUMAN	16919	4,56	255	11(8)
2	Tropomiozin alfa-3 lanac	TPM3	P06753	TPM3_HUMAN	32799	4,68	140	5(4)
3	Retikulokalbin-1	RCN1	Q15293	RCN1_HUMAN	38866	4,86	35	4(1)
4	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	190	12(8)
5	Rani endozomni antigen 1	EEA1	Q15075	EEA1_HUMAN	162367	5,55	130	16(5)
6	Ubikvitin karboksil-terminalna hidrolaza izozim L1	UCHL1	P09936	UCHL1_HUMAN	24808	5,33	129	13(5)
7	Ubikvitin karboksil-terminalna hidrolaza izozim L1	UCHL1	P09936	UCHL1_HUMAN	24808	5,33	381	15(12)
8	Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	HSB1_HUMAN	22768	5,98	56	4(2)
9	Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	HSB1_HUMAN	22768	5,98	645	19(16)
10	Fosfoglicerat kinaza 1	PGK1	P00558	PGK1_HUMAN	44586	8,30	598	16(12)
11	3-ketoacil-CoA tiolaza, mitohondrijalna	ACAA2	P42765	THIM_HUMAN	41898	8,32	81	5(2)
12	Glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	107	5(3)
13	Heterogeni nuclearni ribonukleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	P22626	ROA2_HUMAN	37407	8,97	451	17(13)
14	Glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	302	16(10)
15	Kofilin-1	CFL1	P23528	COF1_HUMAN	18491	8,22	76	8(4)
16	Profilin-1	PFN1	P07737	PROF1_HUMAN	15045	8,44	204	13(9)
17	10 kDa heat shock protein, mitohondrijalna forma	HSPE1	P61604	CH10_HUMAN	10925	8,89	327	18(13)
18	Peptidil-prolil cis-trans isomeraza A	PPIA	P62937	PPIA_HUMAN	18001	7,68	97	11(4)
19	Glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	117	4(3)
21	Glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	29	2(0)
22	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	85	11(4)
23	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	156	11(7)
24	Cistatin-B	CSTB	P04080	CYTB_HUMAN	11133	6,96	84	1(1)
25	Elongacioni faktor 1-alfa 1	EEF1A1	P68104	EF1A1_HUMAN	50109	9,1	384	11(10)
26	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A3	HNRNPA3	P51991	ROA3_HUMAN	39571	9,1	366	7(6)
27	Peroksiredoksin-1	PRDX1	Q06830	PRDX1_HUMAN	22096	8,27	164	12(6)
28	Peptidil-prolil cis-trans isomeraza A	PPIA	P62937	PPIA_HUMAN	18001	7,68	222	11(6)
29	Glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza	GAPDH	P04406	G3P_HUMAN	36030	8,57	161	5(5)
30	Fosfoglicerat kinaza 1	PGK1	P00558	PGK1_HUMAN	44586	8,30	655	18(14)
31	Kofilin-1	CFL1	P23528	COF1_HUMAN	18491	8,22	73	1(1)
32	Peptidil-prolil cis-trans isomeraza A	PPIA	P62937	PPIA_HUMAN	18001	7,68	106	5(2)
33	Fosfoglicerat kinaza 1	PGK1	P00558	PGK1_HUMAN	44586	8,30	150	16(5)
34	Kalmodulin	CALM1	P62158	CALM_HUMAN	16827	4,09	185	9(8)
35	Galektin-1	LGALS1	P09382	LEG1_HUMAN	14706	5,34	61	5(2)

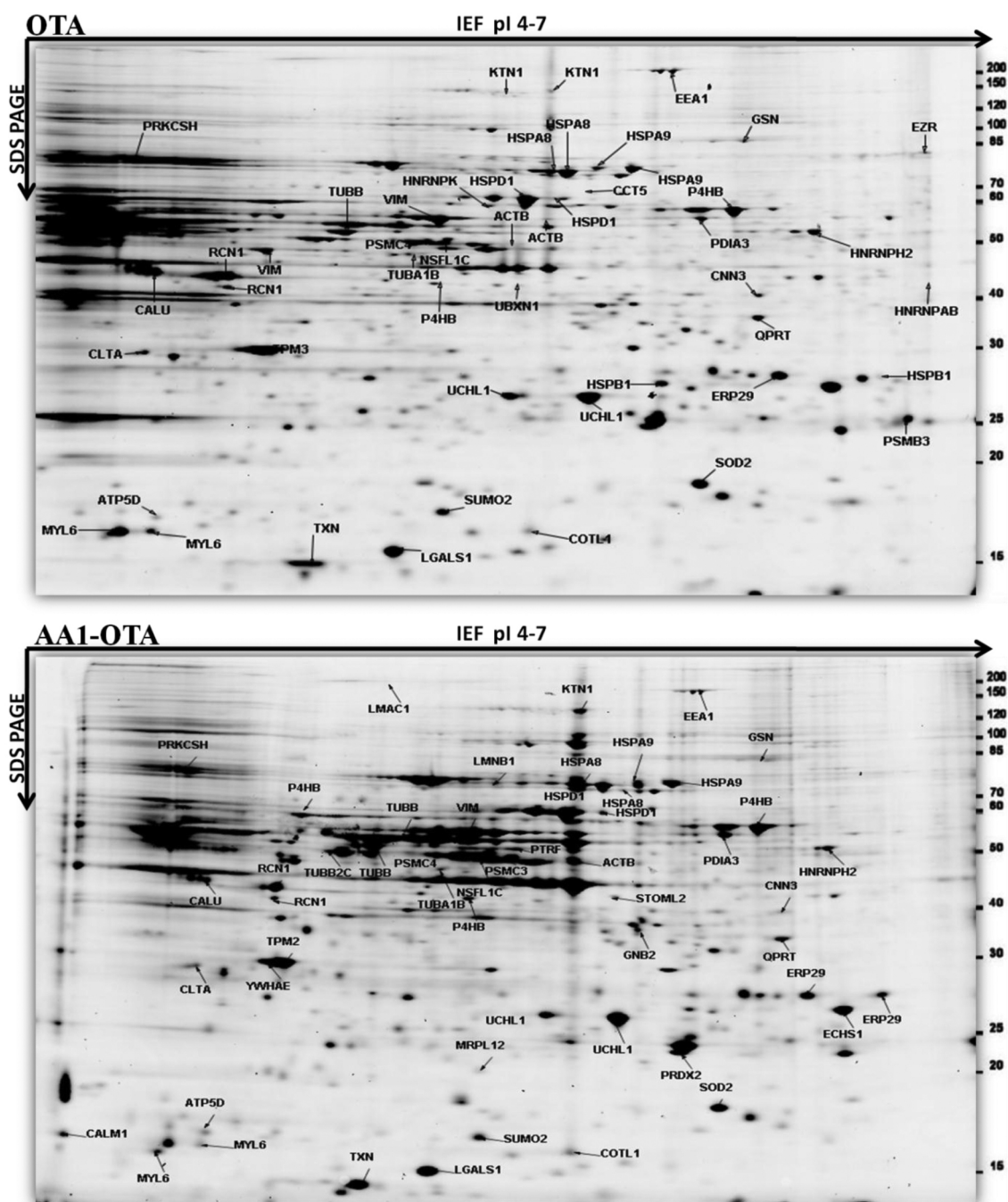
No	Ime proteina	Gensko ime	UniProtKB/ Swiss-Prot	Swiss-Prot	Nominalna Masa	CPI	PMF-scor	PMF- pokrivenost sekvence
36	Superoksid dismutaza [Mn], mitohondrijalna	SOD2	P04179	SODM_HUMAN	24707	8,35	121	6(3)
37	UMP-CMP kinaza	CMPK1	P30085	KCY_HUMAN	22208	5,44	291	10(7)
38	Ubikvitin karboksil- terminalna hidrolaza izoemzim L1	UCHL1	P09936	UCHL1_HUMAN	24808	5,33	505	12(10)
39	Ubikvitin karboksil- terminalna hidrolaza izoemzim L1	UCHL1	P09936	UCHL1_HUMAN	24808	5,33	41	3(0)
40	Enoil-CoA hidrataza, mitohondrialna	ECHS1	P30084	ECHM_HUMAN	31367	8,34	396	12(9)
41	Tropomiozin beta lanac	TPM2	P07951	TPM2_HUMAN	32831	4,68	170	5(4)
42	Protein disulfid-isomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	365	21(13)
43	Tubulin beta lanac	TUBB	P07437	TBB5_HUMAN	49639	4,78	547	20(16)
44	Vimentin	VIM	P08670	VIME_HUMAN	53619	5,06	177	14(8)
45	Aldehid dehidrogenaza X, mitohondrialna	ALDH1B1	P30837	AL1B1_HUMAN	57202	6,36	277	17(9)
46	Aldehid dehidrogenaza X, mitohondrialna	ALDH1B1	P30837	AL1B1_HUMAN	57202	6,36	40	12(0)
47	Miozin laki polipeptid 6	MYL6	P60660	MYL6_HUMAN	16919	4,56	255	11(8)
48	39S ribozomalni protein L12	MRPL12	P52815	RM12_HUMAN	21335	5,01	62	4(2)
49	Peroksiredoksin-4	PRDX4	Q13162	PRDX4_HUMAN	30521	5,86	274	11(9)
50	Enoil-CoA hidrataza, mitohondrialna	ECHS1	P30084	ECHM_HUMAN	31367	8,34	68	8(2)
51	Proteazomna subjedinica beta 3	PSMB3	P49720	PSB3_HUMAN	22933	6,14	93	7(3)
52	Endoplasmatski retikulum locirani protein 29	ERP29	P30040	ERP29_HUMAN	28975	6,77	272	10(7)
53	Proteazom subjedinica alfa tip-1	PSMA1	P25786	PSA1_HUMAN	29537	6,15	138	10(4)
54	DnaJ homologna subfamilija B član 11	DNAJB11	Q9UBS4	DJB11_HUMAN	40489	5,81	49	5(1)
55	Kalponin-3	CNN3	Q15417	CNN3_HUMAN	36391	5,69	172	5(5)
56	Guanin nukleotid-vezujući protein G (I)G (S), G(T) subjedinica beta-2	GNB2	P62879	GBB2_HUMAN	37307	5,6	130	5(3)
57	14-3-3 protein sigma	SFN	P31947	1433S_HUMAN	27757	4,68	203	6(6)
58	Retikulokalbin-1	RCN1	Q15293	RCN1_HUMAN	38866	4,86	40	5(1)
59	Glukozidazna 2 subjedinica beta	PRKCSH	P14314	GLU2B_HUMAN	59388	4,33	141	8(5)
60	Protein disulfid-izomeraza	P4HB	P07237	PDIA1_HUMAN	57081	4,76	384	29(12)
61	Tubulin beta lanac-2C	TUBB2C	P68371	TBB2C_HUMAN	49799	4,79	43	6(1)
62	Hipoksijom regulisan protein 1	HYOU1	Q9Y4L1	HYOU1_HUMAN	111266	5,16	417	27(15)
63	Lamin-B1	LMNB1	P20700	LMNB1_HUMAN	66368	5,11	320	15(8)
64	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K	HNRNPK	P61978	HNRPK_HUMAN	50944	5,39	455	16(13)
65	Polimeraza I i transcriptni oslobađajući factor	PTRF	Q6NZI2	PTRF_HUMAN	43450	5,51	34	2(1)
66	Tioredoxin domen- sadržujući protein 5	LGALS12	Q96DT0	LEG12_HUMAN	48029	5,63	364	11(9)
67	Heat Shock kognat 71 kDa protein	HSPA8	P11142	HSP7C_HUMAN	70854	5,37	176	4(4)
68	Stres-70 protein, mitohondrialni	HSPA9	P38646	GRP75_HUMAN	73635	5,87	520	18(12)
69	Protein disulfid-izomeraza A3	PDIA3	P30101	PDIA3_HUMAN	56747	5,98	667	25(17)
70	Gelsolin	GSN	P06396	GELS_HUMAN	85644	5,90	73	1(1)
71	Ezrin	EZR	P15311	EZRI_HUMAN	69370	5,94	198	11(7)
71	Moesin	MSN	P26038	MOES_HUMAN	67778	6,08	160	6(5)
72	T-compleks protein 1 subjedinica beta	CCT2	P78371	TCPB_HUMAN	57452	6,01	253	11(8)
73	Alfa-enolaza	ENO1	P06733	ENOA_HUMAN	47139	7,01	102	4(2)
75	T-compleks protein 1 subjedinica zeta	CCT6A	P40227	TCPZ_HUMAN	57988	6,23	109	18(5)



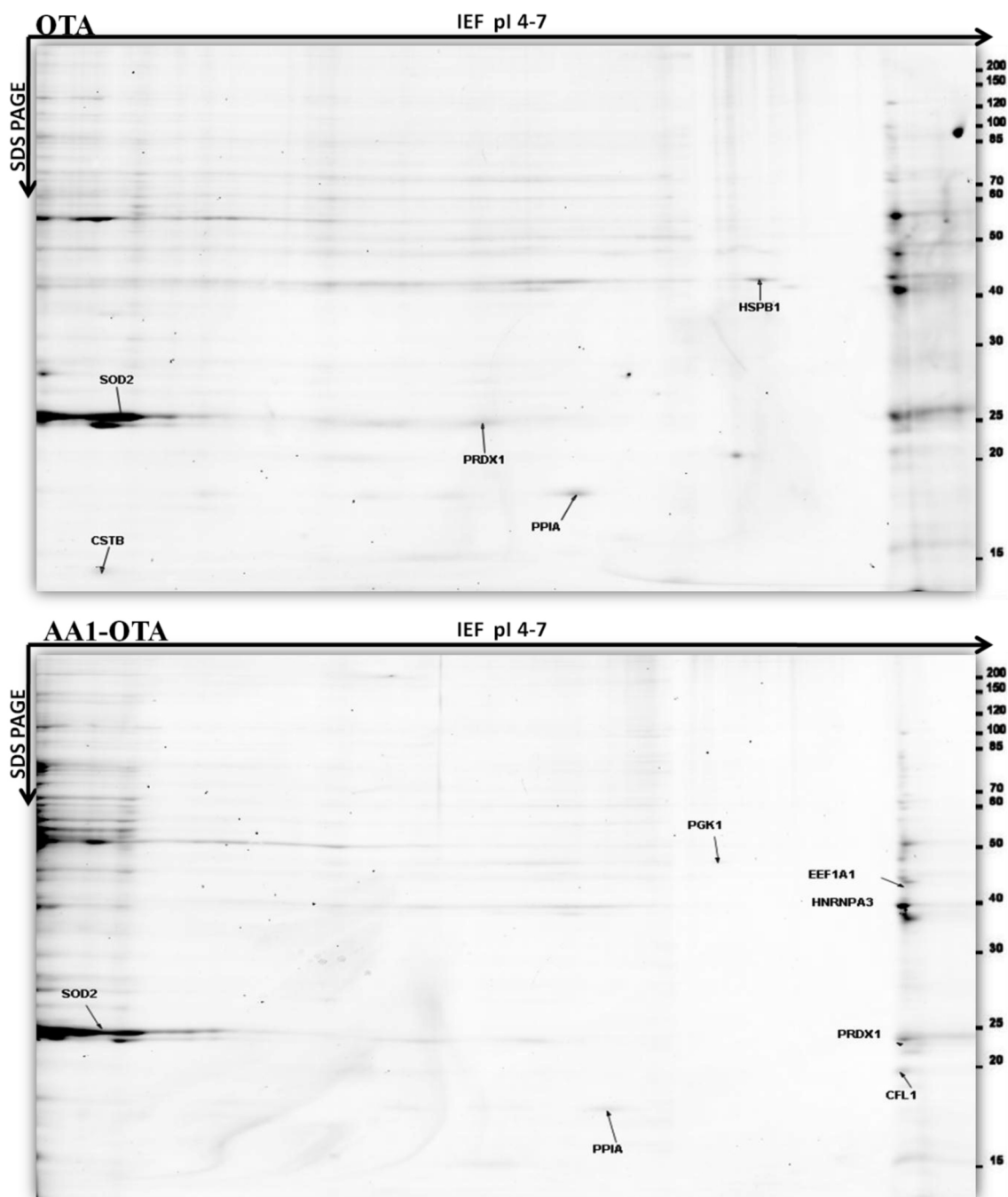
Slika 22. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija bez tretmana (gore) i HK2 ćelija tretiranih 30 dana 0,5 µg/mL AA1 toksinom u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 4-7 rangu i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.



Slika 23. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija bez tretmana (gore) i HK2 ćelija tretiranih 30 dana 0,5 µg/mL AA1 toksinom u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 7-10 rangu i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.



Slika 24. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija tretiranih 30 dana 0,5 ng/mL OTA toksinom (gore) i HK2 ćelija tretiranih 30 dana 0,5 µg/mL AA1 i 0,5 ng/mL OTA toksinima u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pI 4-7 rangu i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.

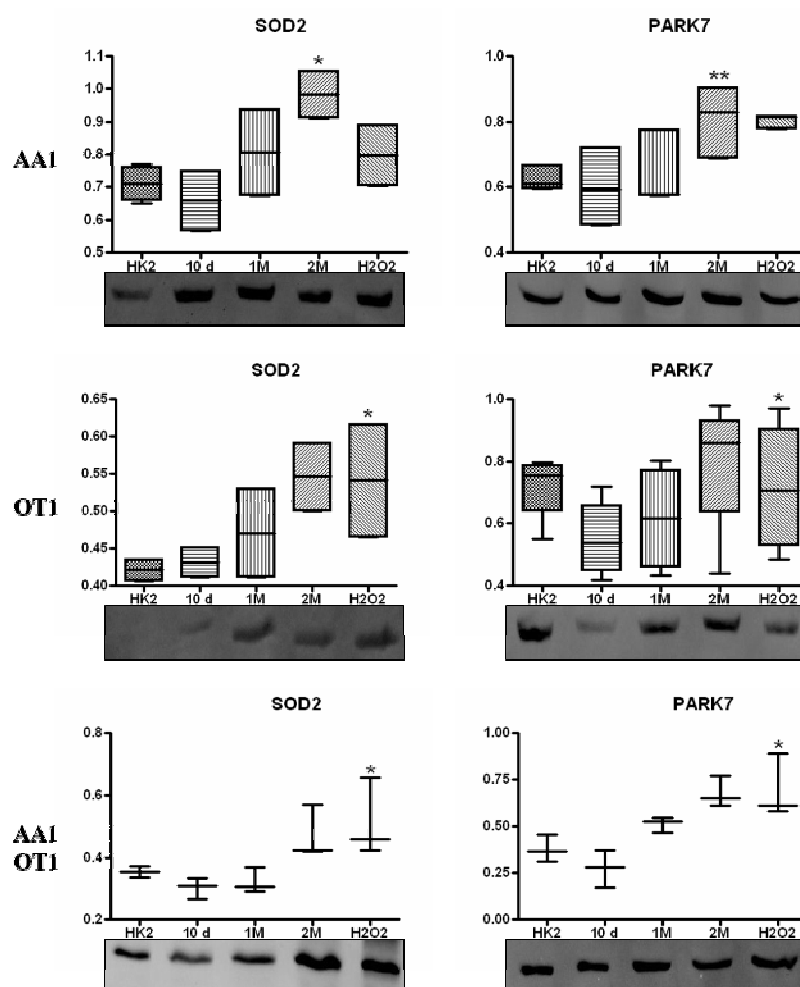


Slika 25. 2D slike identifikovanih proteina HK2 ćelija tretiranih 30 dana 0,5 ng/mL OTA toksinom (gore) i HK2 ćelija tretiranih 30 dana 0,5 µg/mL AA1 i 0,5 ng/mL OTA toksinima u medijumu bez seruma. Proteini su razdvojeni u pl 7-10 rangu i duž 12% SDS PAGE (na osnovu njihove molekularne težine). Identifikovani proteini su obeleženi na gelovima svojim genskim imenima.

4.12 Imunološko potvrđivanje markera oksidativnog stresa u ćelijskim lizatima nakon hroničnog izlaganja HK2 ćelija toksinima

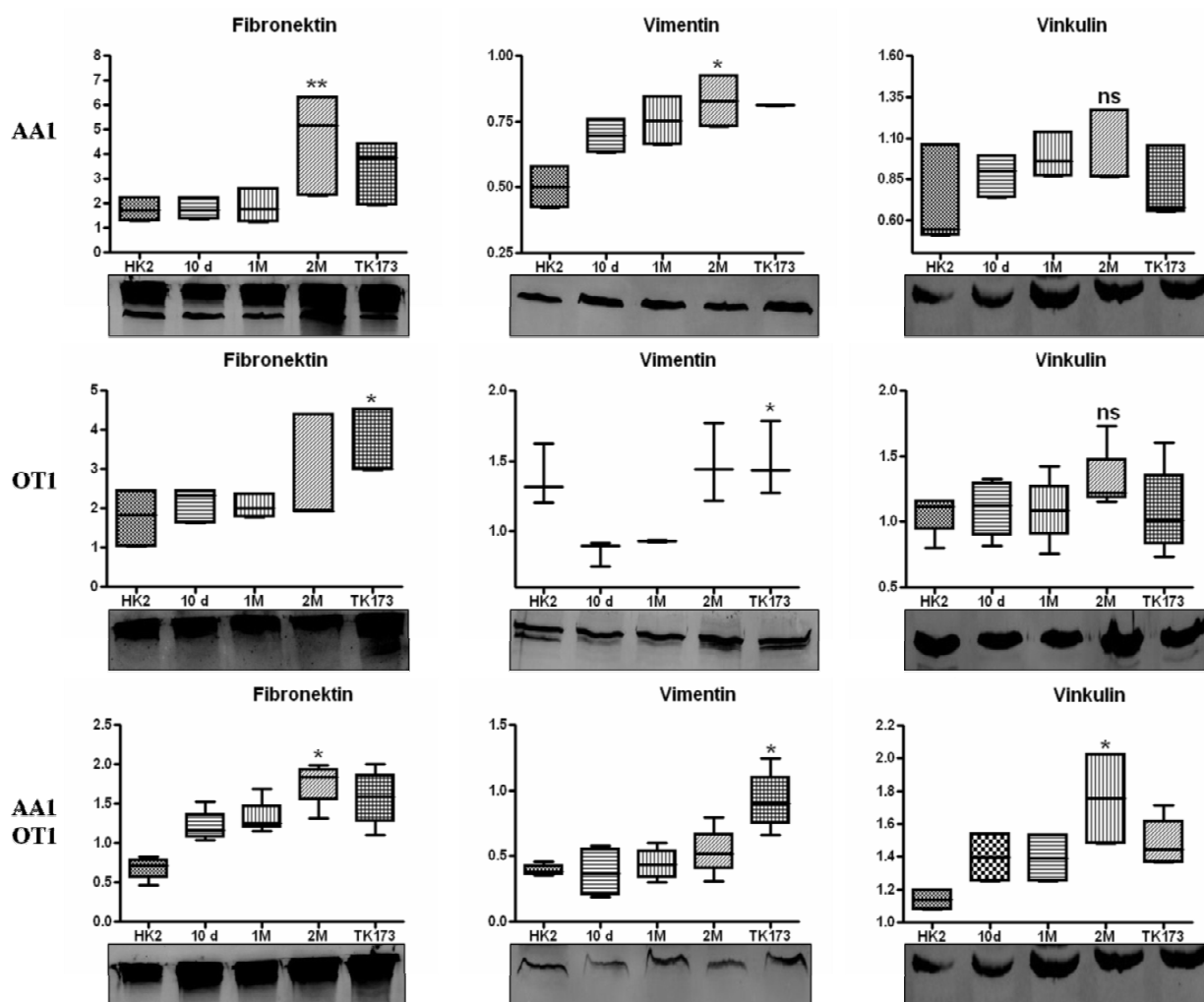
2-DE analiza uzoraka utvrdila je postojanje parametara oksidativnog stresa kao odgovor ćelije na prisustvo toksina u medijumu. Potvrda dobijenih 2-DE rezultata izvršena je Western blot analizom. Ispitivano je postojanje povišenog oksidativnog stresa u tretiranim ćelijama kao odgovor na dejstvo toksina upotrebom odgovarajućih antitela protiv superoksid dizmutaze 2 (SOD2) i proteina DJ-1 (PARK7). Kao pozitivna kontrolna grupa, korišćeni su lizati HK2 ćelija tretiranih 72h rastvorom vodonik peroksida (H_2O_2) i uzgajanih pod istim eksperimentalnim uslovima kao ostale ispitivane grupe.

Značajno povišene vrednosti ovih markera zabeležene su nakon ekspozicije HK2 ćelija AA1, OTA toksinom, kao u tokom kombinovanog tretmana ($p < 0,01$; $p < 0,001$) (**Grafikon 9**).



Grafikon 9. Western blot analiza ekspresije proteina SOD2 i PARK7 kao markera oksidativnog stresa; podaci ističu postojanje razlike između ekspresije ovih proteina u lizatu HK2 bez tretmana u odnosu na lizate toksinima tretiranih ćelija (AA1, OTA, AA1-OTA) u toku 10, 30 i 60 dana, kao i lizat HK2 tretiranih 72h vodonik peroksidom (pozitivna kontrola).

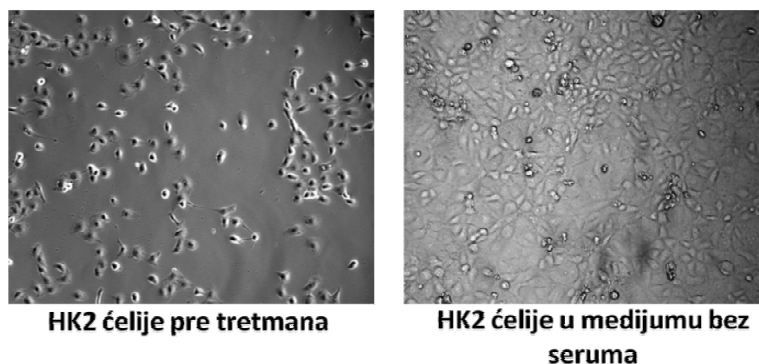
Da bi ispitali efekte toksina na mogućnost fibrozne transformacije tubulocita, i potvrdili rezultate dobijene 2-DE analizom, analizirali smo i postojanje fibrotičnih markera u lizatima tretiranih ćelija (fibronektin, vimentin, vinkulin) nakon 10, 30 i 60 dana. Lizat TK173 ćelija, humanih fibroblasta, koristio je kao pozitivna kontrola (**Grafikon 10**). Fibronektin je bio značajno povišen u lizatima svih tretiranih ćelija, dok su značajno veće vrednosti vinkulina nađene kao posledica kombinovanog tretmana. Vimentin je bio značajno pojačano eksprimiran u HK2 ćelijama tretiranim AA1 i u kombinovanom tretmanu.



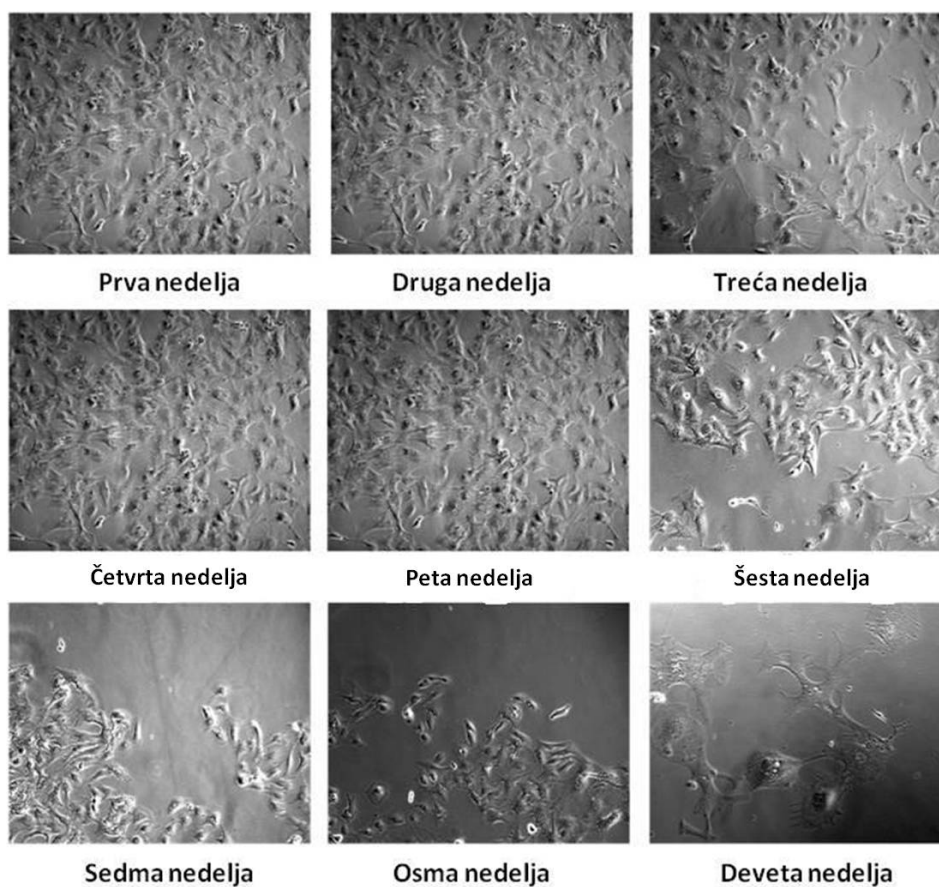
Grafikon 10. Western blot analiza ekspresije proteina fibronektina, vimentina i vinkulina kao markera fibroze; podaci ističu postojanje razlike između ekspresije ovih proteina u lizatu HK2 bez tretmana u odnosu na lizate toksinima tretiranih ćelija (AA1, OTA, AA1-OTA) u toku 10, 30 i 60 dana, kao i lizat TK173 ćelija (pozitivna kontrola).

4.13 Promene u morfologiji tretiranih ćelija

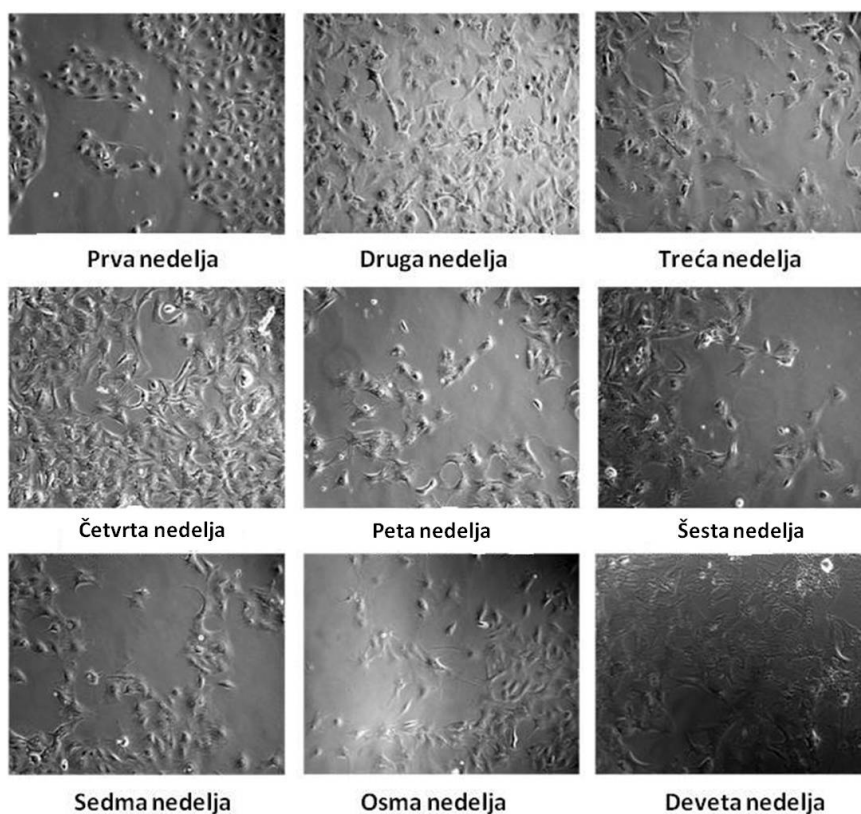
U toku izlaganja ćelija unapred zadatim dozama toksina, praćene su i njihove morfološke promene u zavisnosti od dužine izlaganja (Slika 26-29).



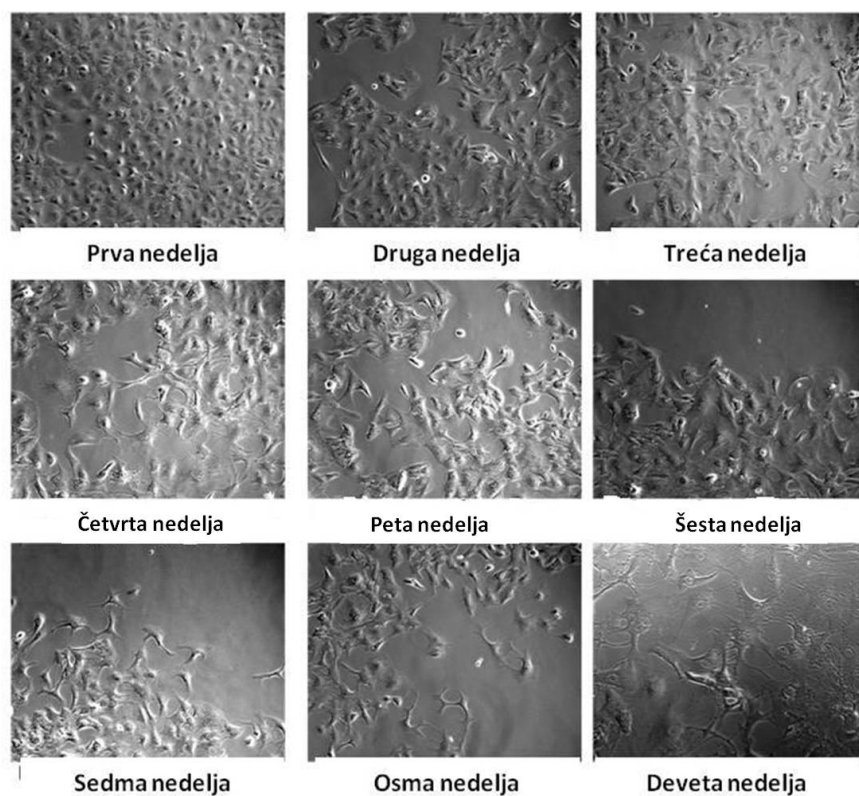
Slika 26. HK2 ćelije pre tretmana (slika levo) i njihova prezentacija u medijumu bez seruma (slika desno)



Slika 27. Izgled HK2 ćelija nakon 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 i 63 dana hroničnog izlaganja 0,5 nm/mL OTA svakodnevno



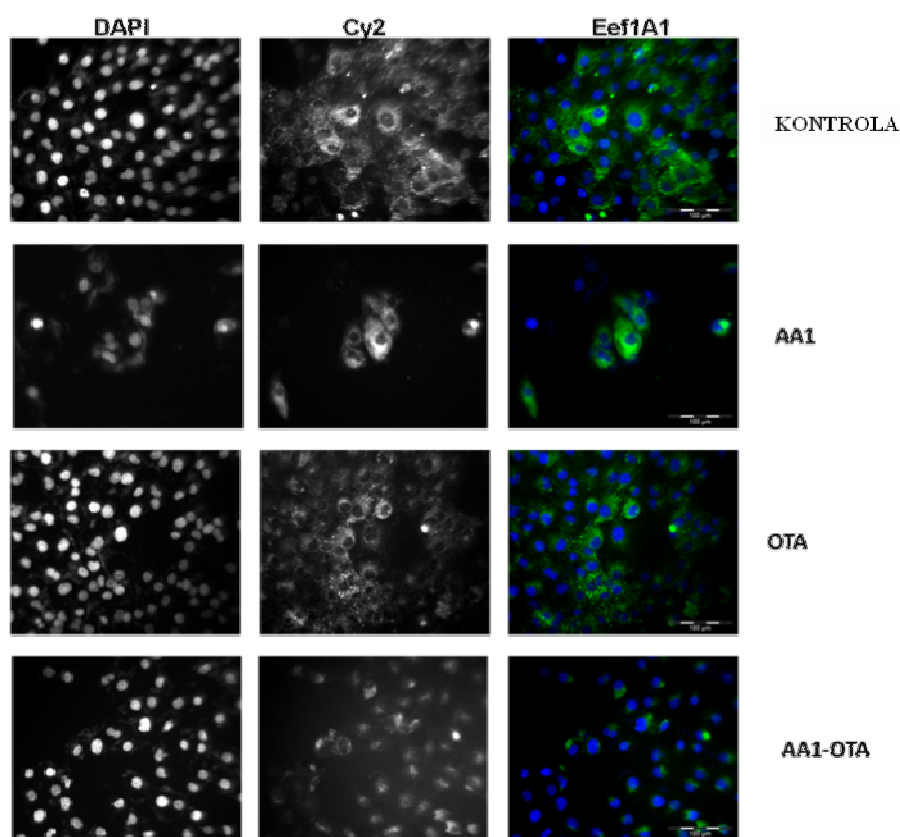
Slika 28. Izgled HK2 ćelija nakon 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 i 63 dana hroničnog izlaganja 0,5 µm/mL AA1 svakodnevno



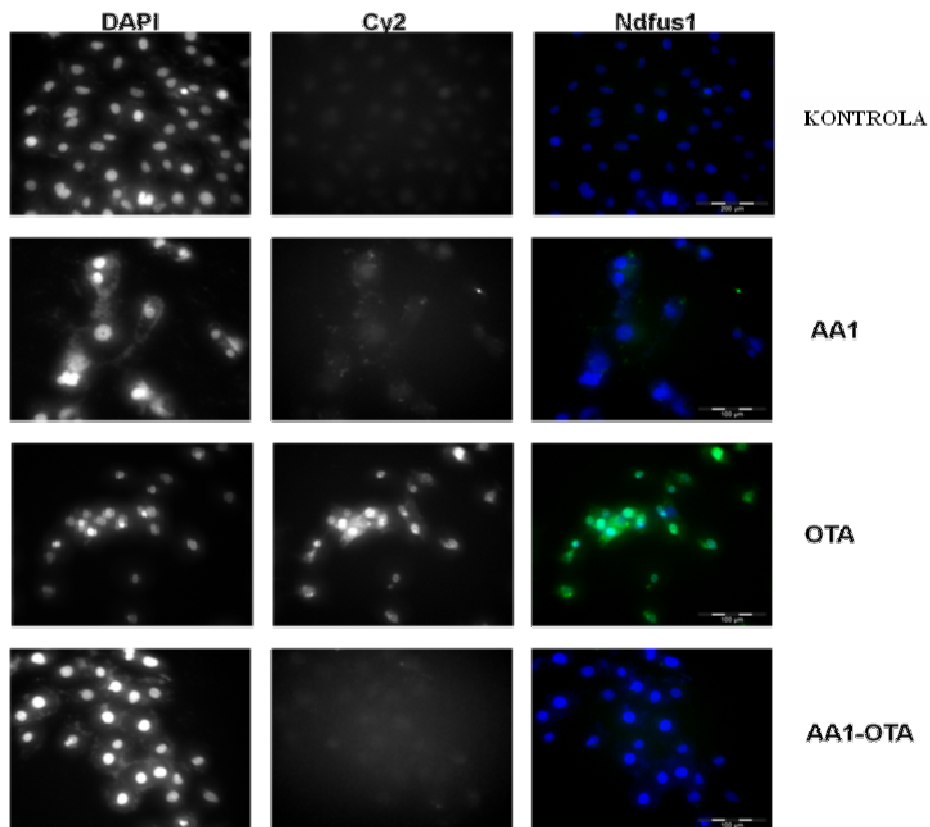
Slika 29. Izgled HK2 ćelija nakon 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 i 63 dana hroničnog izlaganja 0,5 µm/mL AA1 i 0,5 nm/mL OTA svakodnevno

4.14 Proteini koji su značajni u ćelijskom odgovoru na dejstvo toksina – imunobojenja ćelija kao metoda ispitivanja postojanja markera intoksikacije i njihove lokalizacije u ćeliji

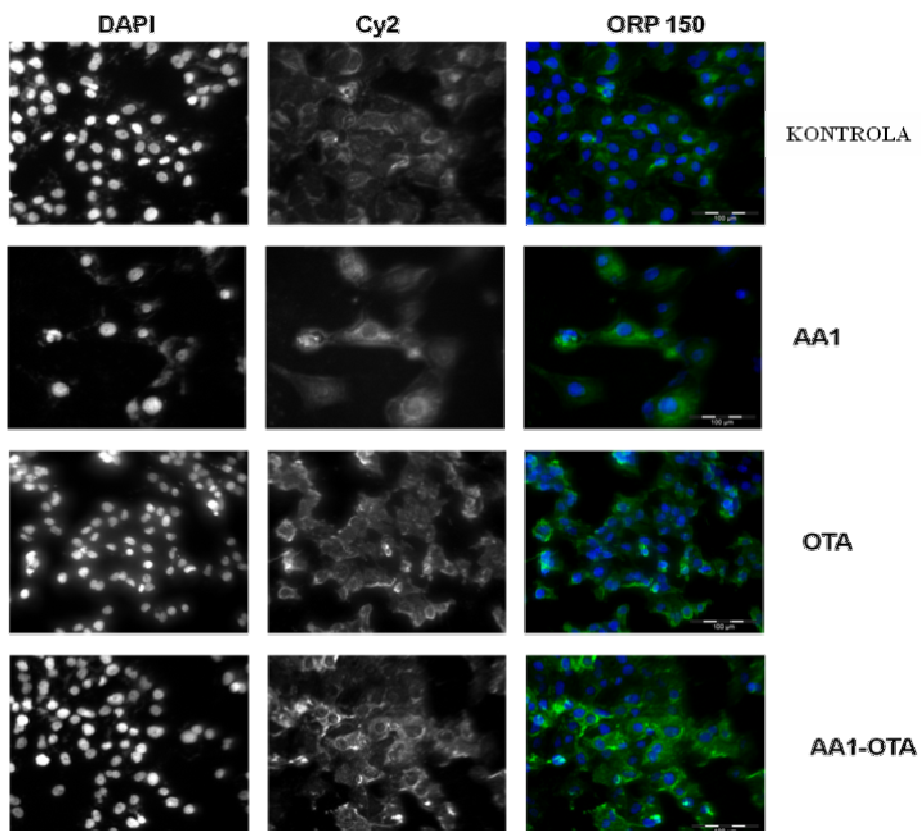
2-DE analiza ćelijskih lizata nakon akutne i hronične intoksikacije ukazala je na postojanje značajnih razlika u ekspresiji proteina različitih eksperimentalnih grupa. Specifična grupa proteina koji neposredno učestvuju u specifičnim regulatornim mehanizmima preko kojih se ispoljava i dejstvo ispitivanih toksina AA1 (elongacioni faktor 1-alfa 1, **Eef1A1** (slika 30), splajsing faktor U2AF 35 kDa subjedinica, **Ndfus1** (slika 31), **Lamin-A/C**) ili OTA (ubikvitin konjugujući enzim E2, **Ube2N** (slika 33), hipoksija pozitivno regulisan protein 1 **ORP 150** (slika 32), eukariotski translacioni iniciacioni faktor 5A-1, **Eif5A**). Uz pomoć imunofluorescentnih bojenja korišćenjem odgovarajućih specifičnih antitela u detekciji ovih proteina, dokazali smo njihovo prisustvo, u skladu sa 2-DE nalazima. Takođe smo ispitivali ekspresiju proteina alfa glatkomišićnog aktina (ACTA2) (slika 34) i fibronektina (FN1) (slika 35) da bi ispitali uticaj ovih toksina na ćelijsku transformaciju.



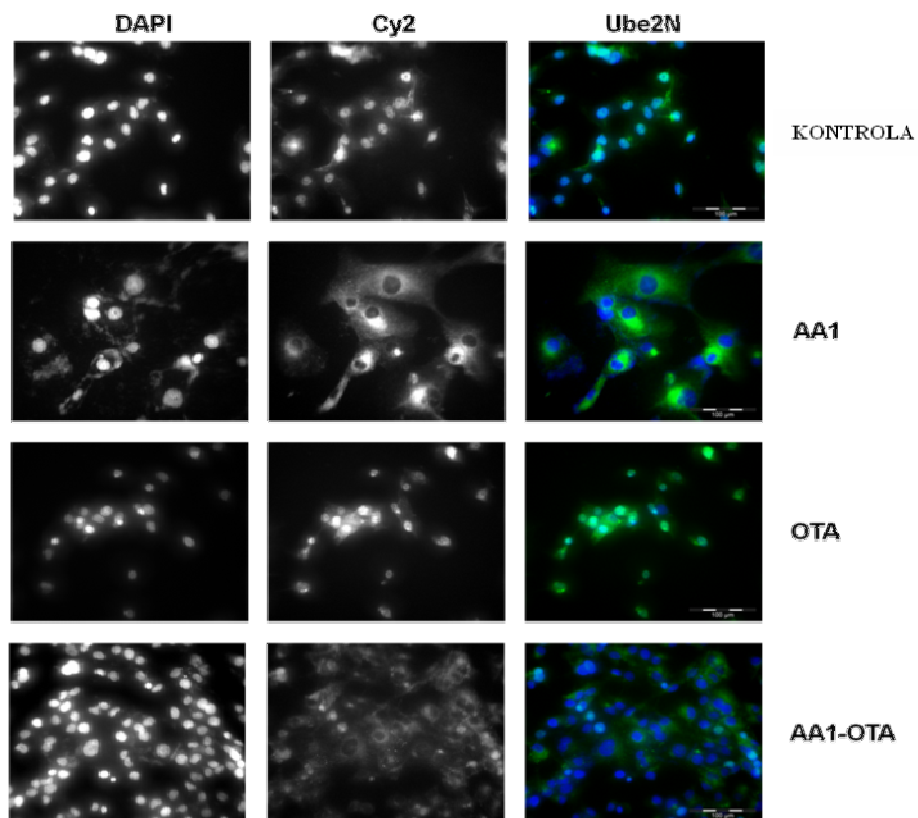
Slika 30. Imunobojenje HK2 ćelija, tretiranih AA1, OTA i kombinovanim AA1-OTA u toku 30 dana. Antitelo protiv elongacionog faktora 1-alfa 1 (Eef1A1) je korišćeno.



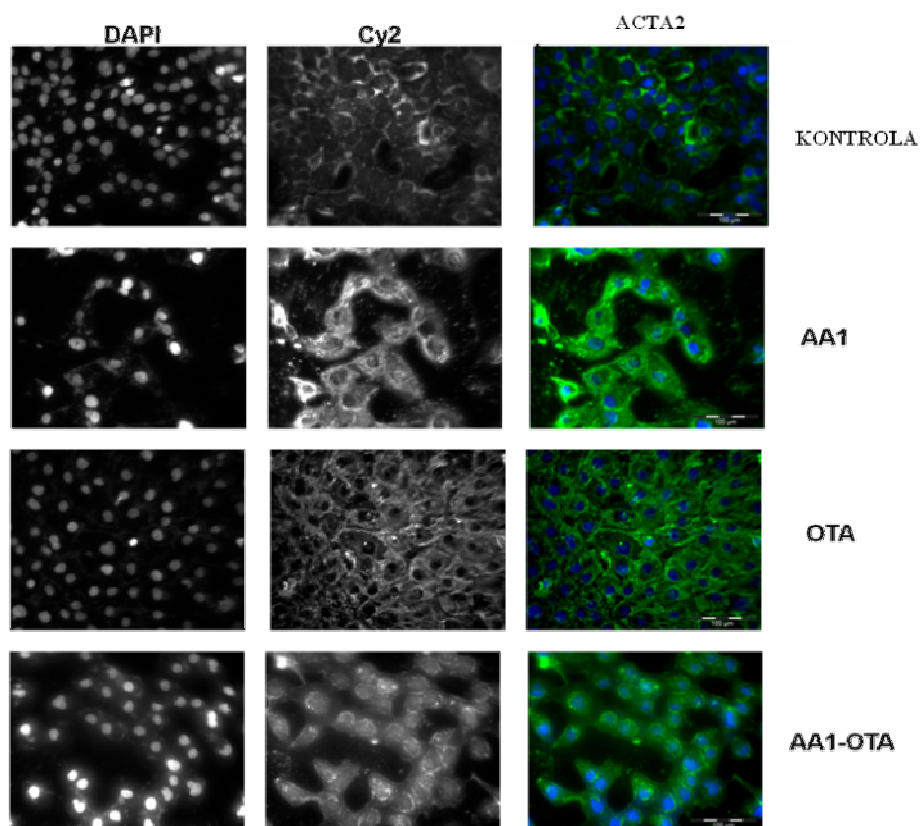
Slika 31. Imunobojenje HK2 ćelija, tretiranih AA1, OTA i kombinovanim AA1-OTA u toku 30 dana. Antitelo protiv splajsing faktora U2AF 35 kDa subjedinica (Ndfus1) je korišćeno.



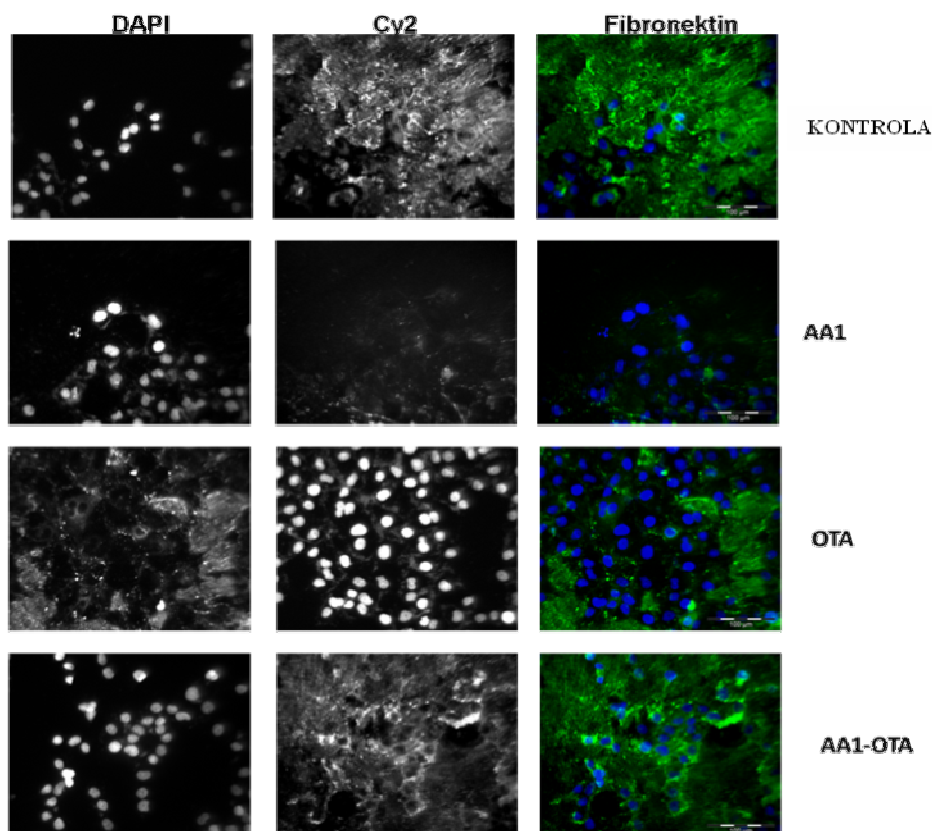
Slika 32. Imunobojenje HK2 ćelija, tretiranih AA1, OTA i kombinovanim AA1-OTA u toku 30 dana. Antitelo protiv hipoksija pozitivno regulisanog proteina 1 (ORP 150) je korišćeno.



Slika 33. Imunobojenje HK2 ćelija, tretiranih AA1, OTA i kombinovanim AA1-OTA u toku 30 dana. Antitelo protiv ubikvitin konjugujućeg enzima E2 (Ube2N) je korišćeno.



Slika 34. Imunobojenje HK2 ćelija, tretiranih AA1, OTA i kombinovanim AA1-OTA u toku 30 dana. Antitelo protiv alfa glatkomišićnog aktina (ACTA2) je korišćeno.



Slika 35. Imunobojenje HK2 ćelija, tretiranih AA1, OTA i kombinovanim AA1-OTA u toku 30 dana. Antitelo protiv fibronektina (FN1) je korišćeno.

4.15 Imunohistološka bojenja preparata tumora gornjeg urotelijuma pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovane endemske nefropatije

Sa ciljem da se ispita povezanost poznatih etioloških faktora u razvoju endemske nefropatije i posledica ove bolesti (maligna transformacija epitela i razvoj tumora urotela), kao što su toksična oštećenja tubulocita nastala izlaganjem ćelija aristolohijske kiseline i ohratoksina A, 60 tkivnih uzoraka koji su sadržali delove tumorskog tkiva gornjeg urotelijuma pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovane endemske nefropatije, ispitivana su imunohistološkim bojenjima upotrebom antitela protiv specifičnih proteina.

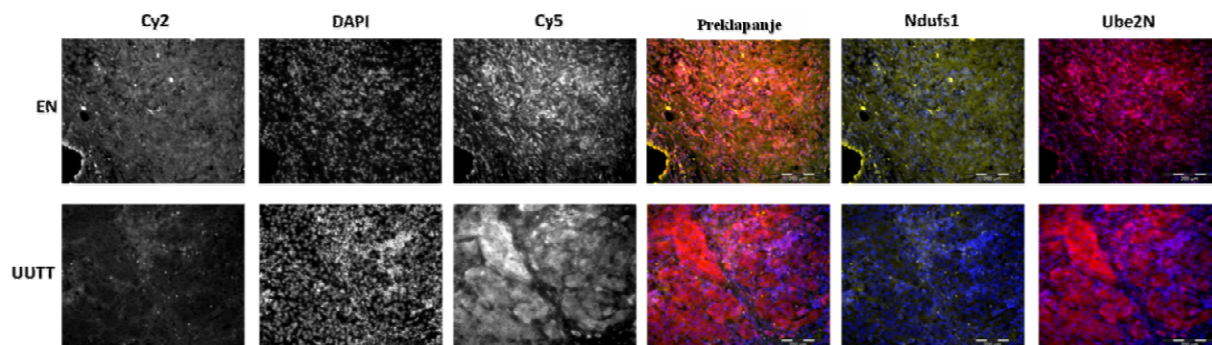
Ispitivano je prisustvo specifičnih proteina (**Eef1A1 (slika 37)**, **Ndfus1 (slika 36)**, **Lamin-A/C (Slika 38)**, **Ube2N (slika 36)**, **ORP 150 (slika 37)**, **Eif5A (Slika 38)**), kao i njihova lokalizacija unutar tumorskog tkiva i tumorskih ćelija.

Sva tumorska tkiva, bez obzira na pripadnost ispitivanoj grupi, pokazala su pozitivnu reakciju na primenjena antitela, što je ukazalo na prisustvo ovih proteina u ispitivanim izorcima.

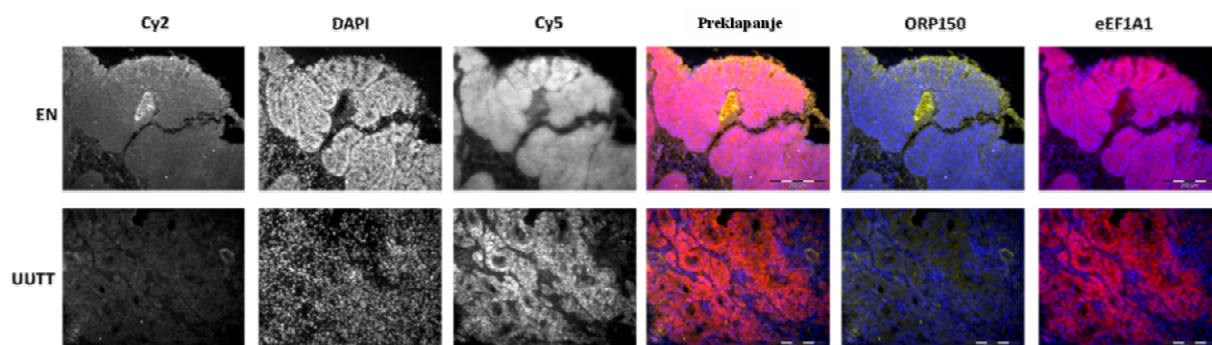
Ndufs1, Eef1A1 i Lamin-A/C su pronađeni u većem obimu i difuzno raspoređeni u tkivu tumora pacijenata sa endemskom nefropatijom u odnosu na tkivo tumora pacijenata bez predhodno dijagnostifikovanog EN-a.

Lamin-A/C je predominantno prisutan u ćelijama tumorskog tkiva u odnosu na okolno tkivo obe ispitivane grupe.

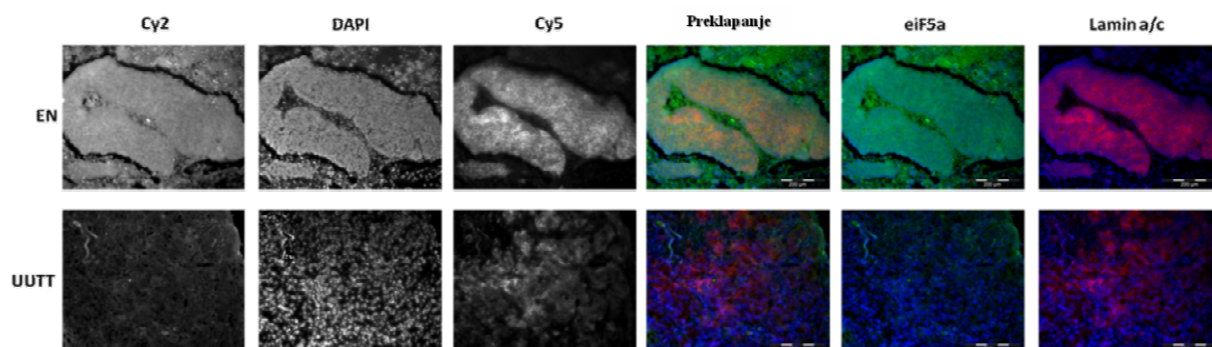
Ube2N je pokazao manju količinu vezanu za pojavu tumora pacijenata sa EN-om u odnosu na drugu eksperimentalnu grupu. ORP 150 i Eif5A prisutni u većoj količini u tumorima EN pacijenata.



Slika 36. Imunofluorescentno bojenje tkiva urotelijalnog karcinoma pacijenata sa predhodno dijagnostifikovanom EN i pacijenata bez predhodno dijagnostifikovane EN (UUTT). Korišćena su antitela protiv Ndufs1 i Ube2N proteina



Slika 37. Imunofluorescentno bojenje tkiva urotelijalnog karcinoma pacijenata sa predhodno dijagnostifikovanom EN i pacijenata bez predhodno dijagnostifikovane EN (UUTT). Korišćena su antitela protiv ORP 150 i eEF1A1 proteina



Slika 38. Imunofluorescentno bojenje tkiva urotelijalnog karcinoma pacijenata sa predhodno dijagnostifikovanom EN i pacijenata bez predhodno dijagnostifikovane EN (UUTT). Korišćena su antitela protiv eif5A i Lamin A/C proteina

5. DISKUSIJA

5.1 Proteini u urinu pacijenata sa endemskom nefropatijom i zdrave populacije koja živi na područjima endemske nefropatije

Kao hronična tubulointesticijalna nefropatija često dijagnostifikovana u kasnom stadijumu hronične bubrežne insuficijencije i sa razvojem komplikacija (urotelijalni karcinomi, terminalna bubrežna insuficijencija, dijaliza, izražena smrtnost pacijenata u okviru jedne godine od trenutka dijagnostifikovanja bolesti), endemska nefropatija (EN) predstavlja kritično polje istraživanja u poslednjih pedeset godina [42, 46, 110-113].

Posmatrano iz ugla epidemioloških istraživanja, pacijenti su pretežno naseljavali ograničene regione Balkanskog poluostrva (naseobine duž reke Dunav u Bosni i Hercegovini, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumuniji i Srbiji), što je ukazivalo na familijarni karakter oboljenja (registrovani su slučajevi obolelih kod većeg broja članova istog domaćinstva, duž jedne ili više generacija) [46]. Prevalenca EN oboljenja u endemskim regionima iznosi od 0.5% do 4.4%, a sama dijagnoza oboljenja postavlja se dosta kasno, često kod pacijenata starijih od 60 godina [114, 115].

Etiološki činioci koji učestvuju u nastanku i razvoju oboljenja još uvek nisu jasno definisani i često predstavljaju uzrok brojnih diskusija [53, 116-120]. Genetska predispozicija oboljenja dokazana je od strane nekih autora i opisana je postojanjem specifičnih genetskih markera na hromozomu 3, 3q25 koji ukazuju na mogućnost razvitka oboljenja kod nosioca [121]. Međutim, ovi podaci još uvek nisu potvrđeni na velikom populacionom uzorku. Rezultati drugih istraživanja govore u prilog postojanju dve genetički različite populacije koje mogu u toku života da obole od EN-a, što indirektno ukazuje na značaj faktora okoline u nastajanju i progresiji oboljenja. Samim tim, ističe se veći značaj uticaja spoljnih faktora u razvoju oboljenja od genetske predispozicije [114].

EN karakteriše prisustvo disfunkcije tubula, predominantno zahvatajući proksimalne tubule [42, 122]. Glikozurija i aminoacidurija, tubularni tip proteinurije su čest nalaz kod ovih pacijenata. Povišene vrednosti izlučenog beta-2-mikroglobulina (B2M) putem urina čest su nalaz kod pacijenata sa endemskom nefropatijom, njihovih klinički zdravih rođaka, odrasle dece EN pacijenata, ili osoba koje su u bliskom srodstvu sa EN obolelim [122, 123]. Konačna dijagnoza EN-a zasnovana je na epidemiološkim podacima, prisustvom smanjenja glomerularne filtracije, proteinurije, mikroalbuminurije, prisustva markera tubularnog oštećenja (povišene

vrednosti B2M i alfa-1-mikroglobulina (AMBP) u urinu), kao i na isključivanju mogućnosti postojanja nekog drugog poznatog bubrežnog oboljenja [66].

Ovakvi kriterijumi ne omogućavaju laku ranu i preciznu dijagnostiku EN-a, pa kasno postavljena dijagnoza bolesti onemogućava adekvatno dejstvo i efikasnost primenjene terapije.

Proteom plazme sadrži nekoliko hiljada proteina [124], dok je i urinarni proteom zdrave osobe takođe kompleksan (delom reflektuje proteom plazme). DUP baza podataka, (<http://www.sysdiag.cnrs.fr//index.php?page=dup>), sadrži preko dve hiljade jedinstvenih urinarnih proteina koji su identifikovani prilikom proteomskih analiza normalnog urina, među kojima se ne nalaze proteini opisani od strane drugih istraživača [125]. U istraživanju smo koristili proteomsku tehnologiju sa imunološkim konfirmacionim metodama da bi ispitali pouzdanost urina kao dobrog supstrata za dokazivanje i identifikaciju markera koji bi diskriminirali EN od ostalih bubrežnih oboljenja i time olakšali njegovu ranu dijagnostiku sa značajnom sigurnošću i pouzdanošću. Analiza proteinskog sastava urina se pokazala kao metoda izbora u istraživanju markera mnogih kako bubrežnih, tako i oboljenja drugih sistema i organa.

Uz pomoć masene spektrometrije i pretrage verifikovanih baza podataka identifikovali smo ukupno 213 proteina u zbirnim uzorcima koji odgovaraju 61 jedinstvenom proteinu. Većina identifikovanih proteina vodi poreklo iz seruma i učestvuju u značajnim fiziološkim funkcijama u organizmu, kao što je transportna uloga hranljivih materija, hormona i krajnjih produkata metabolizma proteina i ugljenih hidrata, hemostatska uloga, regulacija acidobazne ravnoteže i metabolizma elektrolita. Deo proteina je ćelijskog porekla, sa značajnom ulogom u metabolizmu nukleinskih kiselina, procesima regulacije transkripcije naslednog materijala i translacije, postranslacionim modifikacijama proteina na nivou endoplazmatskog retikula, regulaciji oksido-reduktivne aktivnosti enzima na nivou mitohondrija, transportu materija iz ekstracelularnog prostora u ćeliju, i drugih funkcija. U poređenju kvalitativnih karakteristika proteomske mape urina pacijenata sa EN-om i proteomskih mapa urina drugih oboljenja (kao što je dijabetesna nefropatija, prerenalna bubrežna insuficijencija) na osnovu podataka iz literature, potvrdili smo podudarnost za 25-31 od 61 identifikovanog proteina [126-128].

5.2 Urinarni proteinski markeri ranog oštećenja bubrežnog tkiva pacijenata sa endemskom nefropatijom

U ovoj studiji, za razliku od predhodno opisanih u literaturi, rezultati otkrivaju listu proteina koji do sada nisu prijavljeni ni kao komponente urina zdravih osoba, ali ni kao potencijalni markeri specifičnih i do sada ispitivanih oboljenja. To se posebno odnosilo na manoza vezujući lektin (LMAN2), protektor telomera protein 1 (POT1) i superoksid dizmutaza [Cu-Zn] (SOD1)

koji su tokom dalje analize naših podataka pokazali veliki značaj u diferencijaciji EN-a od ostalih oboljenja. Za razliku od zdravih ispitanika iz ne-endemskih regiona, ispitanici koji su živeli u EN regionima a nisu bili oboleli od ove bolesti takođe su izlučivali specifične proteine putem urina.

Kao što je bilo dokazano predhodnim istraživanjima, rezultati su potvrdili značajno veće vrednosti AMBP i B2M u urinu pacijenata sa EN-om u poređenju sa kontrolom (HEN i HGER) i pacijenata sa AKI. U predhodnoj studiji [129] rutinskim laboratorijskim analizama urina istraživan je značaj B2M, AMBP, albumina i ukupnih proteina u urinu u dijagnozi EN-a, i dokazana je jasna diskriminaciju EN-a u odnosu na glomerulonefritise (GN), nefroskleroza (NS) i zdrave ispitanike sa visokom specifičnošću i senzitivnošću. Kod pacijenata sa EN-om, AUC krive za urinarni B2M (0,828) i AMBP (0,782) bile su većih vrednosti u odnosu na urinarni albumin (0,740), dok je kod pacijenata sa GN-om AUC krive za urinarne proteine (0,854) i albumin (0,872) bile značajno veće u poređenju sa ova dva proteina male molekularne mase. AUC krive za sva četiri ispitivana parametra u pacijentima sa NS-om značajno su manje nego kod EN pacijenata, rangirajući se u opsegu od 0,500 do 0,595. Upoređujući EN sa zdravom kontrolom, B2M je bio veće senzitivnosti i specifičnosti sa istim graničnim vrednostima ($p < 0,001$) u odnosu na AMBP ($p < 0,05$). U poređenju EN sa GN, B2M se pokazao kao bolji marker. Iako su B2M, AMBP i albumin često korišćeni kao markeri EN-a, teško da se mogu iskoristiti u diferencijaciji EN od HEN ispitanika, jer se ovi markeri gotovo podjednako nalaze u urinu ispitanika obe grupe. Čak se jasno detektuju i u urinu pacijenata obolelih i od drugih bubrežnih oboljenja (na primer DN, reakcija na prisustvo alografta bubrega i druga) [130-133] i ne mogu se smatrati EN specifičnim.

U našoj studiji, validacija B2M i AMBP kao EN markera je potvrđena, uz pronalazak četiri nova proteina u urinu kao potencijalnih markera EN-a. Posebno je SOD1 značajan u diskriminaciji EN pacijenata sa visokom specifičnošću i senzitivnošću metode i može se smatrati čak i boljim markerom u odnosu na same B2M i AMBP. B2M i AMBP se ne mogu izolovano posmatrati kao specifični markeri EN-a s obzirom da su pronađeni u urinu pacijenata i drugih oboljenja (kao na primer kod pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom) [126, 134].

B2M je protein molekularne mase 13,7 kDa. Čini komponentu (beta lanac) glavnog histokompatibilnog kompleksa (MCH) klase I i učestvuje u prezentaciji peptidnih antigena ćelijama imunog sistema. U osnovi je heterodimer koji se sastoji iz jednog alfa i jednog beta peptidnog lanca. B2M polimeri se mogu naći difuzno u tkivu pacijenata koji su na hroničnom hemodijaliznom tretmanu. Glikacija, kao česta ne-enzimska reakcija u toku hroničnih metaboličkih bolesti, najčešći oblik je patološke modifikacije B2M-a i može se koristiti u dijagnostičke svrhe [135].

AMBP je protein molekularne mase 39 kDa. Kao inter-alfa-tripsin-inhibitor učestvuje u inhibiciji tripsina, plazmina i lizozomalne granulocitne elastaze. Inhibira kristalizaciju kalcijum oksalata. Sastoji se od jednog ili dva teška lanca (H1, H2 ili H3) i jednog lakog lanca, bikunina. AMBP se pojavljuje kao monomer, ali i u sklopu kompleksa sa IgA antitelom ili gradi komplekse sa albuminom. AMBP interaguje sa fibronektinom (FN1). Tripsatin je poseban oblik ovog proteina koji se takođe javlja u obliku kompleksa sa triptazom u mastocitima. AMBP i bikunin (preko SH3 domena) interaguju sa brojnim proteinima i učestvuju u njihovom transportu. Nastaje u jetri i sekretuje se u krv. U fiziološkom smislu, normalni je sastojak plazme, a u malim količinama nalazi se u urinu i cerebrospinalnoj tečnosti. Njegova intermedijerna forma, inter-alfa-tripsin inhibitor prisutan je u plazmi i u većoj količini u urinu. Oksidisan metabolit triptofana, 3-hidroksi-kinurenin, autokatalizacijom u prisustvu AMBP-a formira heterogene polistične hromofore uključujući hidrosiksantohromatin. Ova reakcija, kada humani proteini formiraju hromofore posebno je izražena u prisustvu bakterijskih i insektnih ćelija. Hromoforama se delom pripisuje inhibitorna uloga broja intracelularnih enzima, što je dokazano samo eksperimentalnim istraživanjima *in vitro* [136].

Beta-2-glycoprotein 1 (APOH) je protein molekularne mase 38,3 kDa, koji na osnovu svoje strukture pripada regulatorima familije proteina koji aktiviraju komplement. U ranijim istraživanjima istaknuta je njegova uloga kao markera akutnog oštećenja tubula [137]. U brojnim radovima ističe se njegova antigenska uloga u nastajanju antifosfolipidnih antitela koja imaju značajnu ulogu kao reaktanti akutne faze. Vezuje se za brojne negativno naelektrisane substance u organizmu kao što je heparin, fosfolipidi i dektran sulfati. Može učestvovati u sprečavanju razvoja unutrašnjeg puta aktivacije koagulacije, vezujući se za fosfolipide na površini oštećenih ćelija. APOH nastaje u hepatocitima, gde su geni za ovaj protein značajno eksprimirani. Iz hepatocita, APOH se direktno sekretuje u krv [138].

Protektor telomera protein 1 (POT1) je DNK vezujući protein molekularne mase 71,4 kDa, koji je sastavni deo telomera i ima značajnu ulogu u održanju stabilnosti hromozoma, prevenciji nekontrolisane ćelijske deobe i razvoja maligniteta. Kao komponenta telometaznog ribonukleoproteinskog (RNP) kompleksa esencijalan je u procesima replikacije terminalnih delova hromozoma. POT1 je i komponenta dvostrukog lanca DNK-vezujućeg TRF1 kompleksa koji učestvuje u regulaciji dužine telomera preko cis-inhibicije telomerazne aktivnosti. Kao protein koji može i samostalno da se veže za telomerni lanac dvolančane DNK, smatra se i negativnim regulatorom TRF1 kompleksa, gde učestvuje u kontroli dužine DNK lanca na terminalnom kraju telomera. Čini i komponentu šelterin kompleksa (telozoma) koji je takođe uključen u kontrolu dužine telomera. Šelterin učestvuje u stvaranju dvostrukih repetitivnih lanaca

koji se sastoje iz TTAGGG. Ovi repetitivni lanci postavljaju se na hromozomalne krajeve pomoću enzima telomeraze. Njihova protektivna uloga je veoma važna u prevenciji nastanka DNK oštećenja pod dejstvom brojnih genotoksičnih supstrata. POT1 se javlja u obliku homomomera ili homo-oligomera [139].

Superoksid dizmutaza [Cu-Zn] (SOD1) je homodimer molekularne mase 16 kDa, koji sadrži bakar i cink u svojoj strukturi, i uvek je intracelularno lokalizovan. Pripada porodici Cu-Zn superoksid dizmutaza. Njegovo prisustvo u urinu ukazuje na postojanje akutnog oštećenja ćelija bubrega [140]. Neutrališe slobodne radikale nastale u toku normalnih metaboličkih procesa u ćeliji, i sprečava njihovo toksično dejstvo [141].

Vezikularni integralni membranski protein VIP36 (LMAN2, molekularna masa 40 kDa) je značajna komponenta svih epitelijalnih ćelija. Pripada grupi intracelularnih lektina i učestvuje u ranoj fazi ćelijske sekrecije. Učestvuje u transportu makromolekula, posebno glikoproteina koji sadrže manozu, preko ćelijske membrane u intracelularni prostor [142]. Ekspimiran je u svim ćelijama. Značajno veće koncentracije LMAN2-a pronađene su u ćelijama skeletnih mišića i bubrega u odnosu na druga tkiva i organe [143], ali se povišene vrednosti javljaju u urinu pacijenata obolelih od IgA nefropatije, dijabetesne nefropatije, ishemijske tubularne nekroze i transplancije bubrega [144].

Usled kompleksnosti patogenetskih mehanizama EN-a, značaj grupe ispitivanih markera u ranoj dijagnostici i prevenciji veći je u odnosu na značaj svakog markera posebno. 2D-DIGE analiza u kombinaciji sa imunološkom konfirmacijom dobijenih rezultata, ukazuje na značaj upotrebe svih šest proteina kao markera u dijagnostici EN-a. U toku studije, jasno smo diskriminirali pacijente sa EN-om od pacijenata sa AKI-om i DN-om. Rezultati su pokazali značajne razlike u ekskreciji proteina zdravih ispitanika iz endemskih i ne-endemskih područja. Pojava grupe ispitivanih proteina u urinu zdravih ispitanika koji žive u EN regionima, ukazuje na njihov potencijalni značaj i u ranoj dijagnostici oboljenja, kada još uvek nisu ispoljeni klinički znaci i simptomi razvoja oboljenja.

5.3 Urinarni proteinski markeri glomerularnog oštećenja u toku razvoja dijabetesne nefropatije – nalaz markera u urinu EN pacijenata kao znak progresije oboljenja

Poslednjih pet godina dijabetesna nefropatija predstavlja žižu proteomskih istraživanja [145]. Ispitivanje proteomike urina pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom česta je tema istraživanja sa ciljem da se pronađu markeri nastanka i razvoja ovog oboljenja [146].

S obzirom da se prve promene bubrežnog oštećenja javljaju na strukturama glomerula, očekivano je detektovati proteine plazme u urinu koji su nastali kao posledica poremećaja glomerularne filtracije i posledične povećane glomerularne propustljivosti, ćelijske proteine kao posledice oštećenja integriteta ćelijskih membrana i izlaska ovih proteina u spoljašnju sredinu (proteini podocita, endotela kapilara), proteine koji se javljaju u odgovoru organizma na zapaljensku reakciju (proteini akutne faze, citokini, limfokini) kao i u procesima sanacije oštećenja tkiva i ćelija (fibrotični markeri). Proteini mogu biti i poreklom iz urinarnih egzozoma [147], ali njihovo prisustvo u urinu nije značajno u patogenezi dijabetesne nefropatije. Takođe se mogu naći i proteini poreklom iz deskvamiranih epitelijalnih ćelija iz gornjih i donjih partija urinarnog trakta. Značajno je postojanje specifičnih hemijskih promena u strukturi proteina tokom razvoja DN-e. To se naročito odnosi na prisustvo glikozilisanih proteina i peptida u urinu kao posledica neenzimske reakcije u kontaktu sa povišenim koncentracijama glukoze u krvi i urinu bolesnika sa DM [146, 148].

Brojni istraživači, proučavanjem patogenetskih mehanizama nastanka nekog oboljenja, kao i načina delovanja različitih etioloških faktora, pokušavaju da definišu potencijalne markere oboljenja [148]. Najveći broj potencijalnih markera oboljenja predstavljaju komponente ekstracelularnog prostora ili faktori rasta koji promovišu razvoj ekstracelularnog matriksa. Kolagen tipa IV i fibronektin, identifikovani su kao komponente ekstracelularnog matriksa koje se eliminišu urinom i mogu predstavljati potencijalne markere oštećenja bubrežnog tkiva, posebno u ranom stadijumu razvoja dijabetesne nefropatije [149, 150]. U slučajevima ekskretovanog tumorskog faktora rasta beta, TGF- β opisane su signifikantno povišene vrednosti kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i postojanjem mikroalbuminurije ili makroalbuminurije [151]. Takođe su faktori rasta, urinarni faktor rasta vezivnog tkiva (CTGF) i urinarni vezikularni endotelijalni faktor rasta 1 (VEGF) predloženi kao prediktori razvoja bubrežnog oštećenja usled postojanja šećerne bolesti [152, 153].

Povišene vrednosti albumina u urinu za sada su pouzdan parametar za praćenje postojanja glomerularnog oštećenja i razvoja oboljenja, ali je istaknuta potreba za markerom koji će ukazati i na ranije promene, dok su glomeruli još uvek očuvane funkcije i strukture. Dosadašnja istraživanja ukazala su na postojanje određenih diferencijalno ekskretovanih proteina kod pacijenata u različitim stadijumima bolesti. Analiza urina pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i mikroalbuminurijom uz pomoć 2-DE pokazala je značajno povećanu eliminaciju putem urina cink α -2-glikoproteina, α -1-kiselog glikoproteina, AMBP, IgG antitela, pored samih albumina [154]. Autori su ih predložili kao potencijalne markere praćenja progresije bolesti.

2D-DIGE analiza urina pacijenata sa uznapredovanom formom DN-e (nalaz makroalbuminurije) u poređenju sa analizom urinom zdrave populacije pokazala je značajne kvalitativne i kvantitativne razlike u proteinskim mapama [155]. Opisane su značajno povišene vrednosti α -1-antitripsina u urinu pacijenata sa uznapredovanom DN-om [156].

Analizirani su i uzorci urina pacijenata sa DN-om i mikroalbuminurijom i pacijentata sa DM-om bez albuminurije, s tim što su svi uzorci urina predhodno oslobođeni prisustva visoko abutantnih proteina (albumin, imunoglobulini, haptoglobin, transferin i drugi) procesom deplecije. Pojedine vrste proteina se nalaze u velikim količinama u urinu, sa značajnim povećanjem u toku specifičnog patološkog procesa. Nazivamo visoko abutantnim proteinima. Većina predstavlja markere glomerularnog oštećenja. Proteini su različitih molekularnih masa, a njihova prezentacija na proteinskim mapama u 2-DE analizi prikazana je pre određenim jasno ograničenim poljima nego samim tačkama. Proteinska polja u većini slučajeva prekrivaju i proteinske tačke onih molekula čija je koncentracija značajno manja u odnosu na abutantne proteine, te je njihova identifikacija otežana (skriveni proteom) [157]. Takav rezultat u stvari ne omogućava potpuni uvid u proteinski sadržaj nekog uzorka, te je neophodno ukloniti ove proteine deplecionim metodama. U predhodnim studijama, pronađene su povišene vrednosti nisko abutantnih proteina u urinu pacijenata sa DN-om i makroalbuminurijom u poređenju sa urinom pacijenata sa DM-om ali bez albuminurije, kao što su α -1-glikoprotein, cink- α -2-glikoprotein, vitamin D vezujući protein, α -2-HS-glikoprotein, S100-kalcijum vezujući protein A9, α -1-antitripsin i hemopeksin [128]. Neophodna je dalja analiza uloge i značaja ovih proteina u nastanku glomerularskih oštećenja.

Većina pronađenih proteina tokom ove i drugih studija, upotrebom proteomske tehnologije u analizi uzoraka urina pripada proteinima akutne faze čije su vrednosti inače povišene u opštem inflamatornom odgovoru. Usled toga, njihov nalaz se može smatrati manje specifičnim za postojanje ranog bubrežnog oštećenja u šećernoj bolesti.

Danas se određeni proteini u urinu dijabetičnih pacijenata dogovorno smatraju markerima glomerularnog oštećenja. To su albumin [158, 159], α -1-antitripsin [128, 160], haptoglobin [126], hemopeksin [126], retinol vezujući protein [126], vitamin D vezujući protein [126], transtiretin [126] i komplement faktor B [128].

Albumin (ALB) je protein molekularne mase 69,4 kDa. Serumski albumin je glavni protein plazme, i ima dobar afinitet za vezivanje molekula vode, kalcijuma, kalijuma, masnih kiselina, hormona, bilirubina i nekih lekova. Njegova glavna uloga je regulacija koloidno-osmotskog pritiska intravaskularnog prostora. Učestvuje i u transportu cinka, gde je preko 80% cika u plazmi vezano za ALB. Varijanse u strukturi albumina mogu rezultovati povećanim afinite-

tom za vezivanje cinka i pojavom simptomatskog deficita cinka u krvi. Albumin vezuje molekule glukoze, a kod dijabetičnih pacijenata pojačana je glikacija (neenzimsko vezivanje glukoze) ovog proteina [161].

Alfa-1-antitripsin (SERPINA1) je protein molekularne mase 46,8 kDa. Predstavlja inhibitor serin proteaza. Njegov primarni supstrat je elastaza, ali postoji i povećan afinitet za proteine plazme kao što su plazmin i trombin. Ireverzibilno inhibira tripsin, himotripsin i plazminogen aktivator. Njegova glavna fiziološka uloga je zaštita donjih partija respiratornog trakta od proteolitičke destrukcije pod dejstvom enzima humane leukocitne elastaze (HLE). Postoji nekoliko funkcionalnih izomera ovog proteina, koji nastaju kao posledica različite kombinacije glikana koji se vezuju na N-terminalnim krajevima proteina. Deo molekula, kratka peptidna forma AAT (SPAAT) je ireverzibilni inhibitor himotripsina i elastaze, ali ne i tripsina. Aberantna forma inhibira insulinom posredovanu sintezu NO u trombocitima, smanjuje vreme koagulacije i proteolitički deluje na insulin i plazmin u trombocitima [162].

Haptoglobin (HP) je protein molekularne mase 45,2 kDa. Vezuje se za tri molekula slobodnog hemoglobina u plazmi sprečavajući direktno oštećenje bubrega taloženjem ovog proteina. Vezivanjem slobodnog gvožđa prevenira njegov gubitak iz organizma putem bubrežne filtracije. Ekspimiran je u jetri a sekretuje se iz hepatocita u krv [163].

Hemopeksin (HPX) je protein molekularne mase 51,7 kDa. Vezuje hem i transportuje ga do jetre gde se vrši dalji katabolizam hema i oslobađanje gvožđa. Nakon oslobađanja hema, slobodan hemopeksin se vraća u cirkulaciju. Pojačano je ekspimiran u jetri, a izlučuje se u krv. N i O glikozilacijom se metaboliše do krajnjih produkata i eliminiše iz organizma preko glomerularne filtracije [164].

Retinol vezujući protein (RBP4) je sekretorni protein molekularne mase 23 kDa. Prenosi retinol od jetre i depozita u jetri do perifernih tkiva i organa. U plazmi, kompleks RBP4-retinol interaguje sa transtiretinom i sprečava njegovu eliminaciju glomerularnom filtracijom iz organizma [165].

Vitamin D vezujući protein (GC) je sekretorni protein molekularne mase 53 kDa. Ovaj vitamin je multifaktorijalan i čini važan element plazme, ascitne tečnosti, cerebrospinalne tečnosti i urina, a prisutan je i vezan za komponente ćelijskih membrana brojnih ćelijskih vrsta. U plazmi učestvuje u transportu sterola vitamina D i sprečava polimerizaciju aktina vezujući se za njegove monomere. GC se vezuje i za imunoglobuline membrane B limfocita i za IgG Fc receptor na membrani T limfocita. Postoji preko 80 varijanti humanog GC proteina [166].

Transtiretin (TTR) je tiroid-hormon-vezujući protein molekularne mase 15,9 kDa. Učestvuje u transportu tiroksina preko krvotoka do moždanog tkiva. Prisutan je i u serumu i u

cerebrospinalnoj tečnosti. Povišeno je eksprimiran u epitelijalnim ćelijama horionnog pleksusa, pigmentnim ćelijama retine i u jetri. Protein ima u svojoj strukturi dva vezujuća mesta za hormon tiroksin, gde L-tiroksin vezuje sa većim afinitetom. Oko 40% plazma transtiretina i plazma retinol vezujućeg proteina cirkuliše u čvrstom protein-protein kompleksu. Kompleks stabilizuje vezivanje retinola za RBP4 i sprečava njegov gubitak preko glomerularne filtracije. TTR ima u svojoj strukturi dva vezujuća mesta za RBP4 [167, 168].

Komplement faktor B (CFB) je protein molekularne mase 85,5 kDa. Deo je alternativnog puta aktivacije komplementa, koji se faktorom D deli na dva fragmenta: Ba i Bb. Bb je serin proteaza koja reaguje sa komplementnim faktorom 3b i generiše C3 ili C5 konvertazu. Učestvuje i u proliferaciji i u diferencijaciji preaktivisanih B limfocita, u brzom širenju monocita u perifernoj krvi, u stimulaciji limfocitne blastogeneze kao i u lizi eritrocita. Ba inhibira proliferaciju preaktivisanih B limfocita [169].

Pošto je poznato da je primarni patogenetski supstrat u razvoju EN-a ćelija epitela proksimalnih tubula bubrega, prisustvo markera glomerulskog oštećenja ukazivalo bi na dalji razvoj bolesti i progresiju oštećenja. Pojava glomerulskih markera u urinu EN pacijenata, kao i povećanje njihove koncentracije u skladu sa razvojem oboljenja, predstavlja dobru metodu za praćenje toka bolesti. Da bi identifikovali proteine koji se smatraju markerima glomerularnog oštećenja (albumin, α -1-antitripsin, haptoglobin, hemopeksin, retinol vezujući protein, vitamin D vezujući protein, transtiretin i komplement faktor B) i diferencijalno su izlučivani putem urina pacijenata sa EN-om u odnosu pacijente sa DN-om, uradili smo 2D-DIGE analize zbirnih uzoraka i uporedili dobijene mape proteoma. Prisustvo markera glomerulskog oštećenja u urinu DN pacijenata značajno je povišeno u odnosu na urin EN pacijenata sa niskim i visokim vrednostima proteinurije (**Slika 4A, 4B**). Marker glomerulskog oštećenja se značajnije javljaju u urinu EN pacijenata u odmaklom stadijumu bolesti (visoke vrednosti proteinurije, **slika 4B**) u poređenju sa urinom zdravih dobrovoljaca uz endemskih područja, što pored oštećenja tubula ukazuje na dodatno oštećenje glomerula tokom razvoja hronične bubrežne insuficijencije.

5.4 Oksidativne lezije humanih tubulocita pri akutnom i hroničnom izlaganju aristolohijskom kiselinom

Dejstvo aristolohijske kiseline (AA) se ispoljava kroz dve međusobno povezane faze – faza akutne reakcije ćelije na prisustvo toksina (pojava prolazne tubularne nekroze) i faza hronične reakcije ćelije na prisustvo toksina (nastanak tubularne atrofije i razvoj fibroze). Usled povećanog stvaranja kiseoničnih radikala u ćeliji, kao jedan od prvih mehanizma toksičnog oštećenja AA nastaje razvoj oksidativnog stresa [83].

Mitohondrijalna superoksid dizmutaza (SOD2) ima molekularnu masu od 24,7 kDa. Pripada familiji gvožđe/mangan superoksid dizmutaza. Uništava slobodne radikale koji nastaju normalno u ćeliji prilikom brojnih metaboličkih procesa. Postraslaciona modifikacija molekula nutracijom ili oksidativnom modifikacijom inhibira njenu katalitičku aktivnost [170]. Posebna oštećenja molekula kao i inhibicija njegove osnovne uloge prisutna je kod pacijenata sa šećernom bolešću [171].

Parkinson disease protein 7 (PARK7) je protein molekularne mase 19,8 kDa, koji učestvuje u zaštiti ćelije od oksidativnog stresa i prevremene ćelijske smrti. Direktno reguliše ekspresiju i stabilnost mitohondrijalnih proteina SLC25A14 i SLC25A27 kao i oksidativno oštećenje indukovano prolaskom kalcijuma kroz oštećenu mitohondrijalnu membranu. Učestvuje u eliminaciji vodonik peroksida (H_2O_2) i zaštiti ćelije od H_2O_2 indukovane ćelijske smrti. Najverovatnije reaguje kao atipična peroksiredoksinu slična peroksidaza koja neutrališe H_2O_2 . Sam protein nema proteolitičku aktivnost. Nakon uklanjanja C-terminalnog peptida, PARK7 postaje aktivna proteaza koja ispoljava citoprotektivno dejstvo u slučaju indukcije apoptoze oksidativnim stresom. Učestvuje u procesu ubikvitinacije proteina. Vezuje se za brojne mRNK koji sadrže multiple kopije GG ili CC motiva i delom inhibiše njihovu translaciju. Predstavlja pozitivni regulator androgen receptor zavisne transkripcije. Kontroliše promociju ćelijskog rasta i ćelijsku transformaciju. Definiše se i kao redoks-senzitivan čaperon. U fiziološkim uslovima, lociran je predominantno u citoplazmi, nešto manje u jedru i mitohondrijama. Kao nuklearni odgovor na pojavu oksidativnog stresa dolazi do njegove translokacije u mitohondrijalni prostor. Prisutan je u velikim koncentracijama u tkivu pankreasa, bubrega, skeletnih mišića, jetre, testisa i srca [172-175].

Peroksiredoksin 1 (PRDX1) ima molekularnu masu od 22 kDa. Učestvuje u regulaciji oksido-redukcije u ćeliji. Redukuje perokside nastale tokom metaboličkih procesa u ćeliji, kao i u toku odgovora ćelije na toksine. Može učestvovati u prenosu signala faktora rasta i tumor nekrotirajućeg faktora alfa preko regulacije intracelularne koncentracije vodonik peroksida. Konstitutivno je eksprimiran u brojnim humanim ćelijama. Aktivno mesto ovog proteina je redoks-aktivni Cys-52 koji se oksidiše u Cys-SOH. Cys-SOH brzo reaguje sa Cys-173-SH druge subjedinice gradeći intermolekularnu disulfidnu vezu između dva homodimera. Regeneracija proteina nastaje pod dejstvom tioredoksina redukcijom disulfidne veze [176, 177].

Peroksiredoksin 6 (PRDX6) ima molekularnu masu od 25 kDa. Učestvuje u regulaciji oksido-redukcionih procesa u ćeliji. Redukuje H_2O_2 i kratke lance organskih, masnih kiselina, kao i fosfolipidne hidroperokside. Ima značajnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja, i nespecifično je pojačano eksprimiran u brojnim ćelijama kao odgovor na oksidativni stres [176, 177].

Tokom akutnog i hroničnog izlaganja HK2 ćelija aristolohijskom kiselinom 1 (AA1) indukcija oksidativnog stresa (detektovane su povećane vrednosti markera oksidativnog stresa, SOD2, PARK7, PRDX1, PRDX6) je signifikantna. Proteini su identifikovani upotrebom 2-DE i masene spektrometrije, a rezultat potvrđen imunološkim metodama. Upoređivali smo lizate ćelija HK2 bez tretmana i lizate HK2 ćelija nakon akutnog tretmana (72h-nom inkubacijom toksinom u koncentraciji od 5µg/mL), dok smo za pozitivnu kontrolu na prisustvo parametara oksidativnog stresa koristili lizate HK2 ćelija predhodno 72h tretiranih vodonik peroksidom. Tokom hroničnog izlaganja HK2 ćelija aristolohijom, detektovan je postepeni porast ekspresije proteina koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti u zavisnosti od dužine perioda izlaganja ćelija toksinom (10 dana, 1 ili 2 meseca).

Hronična intoksikacija aristolohijskom kiselinom je udružena sa poremećenom antioksidativnom zaštitom ćelije usled nepotpune aktivacije enzima antioksidativne zaštite, kao i nastanka mitohondrijalnog oštećenja. Prisutna je prekomerna ekspresija inducibilne NO sintetaze (iNOS) što se manifestuje nalazom povećane ekskrecije azot monoksida (NO) u urinu. U hroničnom eksperimentu, iako je aktivnost glutation peroksidaze, katalaze i SOD2 očuvana, usled kontinuirane produkcije slobodnih radikala, antioksidativna zaštita nije dovoljna u spečavanju daljih oštećenja ćelijskih struktura. Nagomilavanje peroksinitrita usled prekomerne produkcije NO i H₂O₂, učestvuje u razvoju lipidne peroksidacije i posledično nastanku hronične intesticijalne inflamacije [83, 178, 179].

Kao posledica lipidne peroksidacije i oksidativnog oštećenja u ćeliji, dolazi do destabilizacije intracelularnih membrana i poremećaja funkcije intracelularnih komponenti, posebno lizozoma i mitohondrija. Destabilizacija lizozomalne membrane može dovesti do oslobađanja lizozomalnih enzima i ireverzibilnih oštećenja. Fosfolipidi su normalni konstituenti mitohondrijalne membrane i esencijalni za aktivnost određenih mitohondrijalnih enzima. Poremećaj integriteta ove membrane izazvan oksidativnom modifikacijom fosfolipida, dovodi do smanjenja membranskog potencijala i povećanja njene propustljivosti za jone kalcijuma. Povišena koncentracija kalcijuma indukuje povišenu ekspresiju gena za kalpain, protein koji je povišeno eksprimiran u toku reakcije ćelije na prisustvo ovog toksina, a njegova pojava je posebno značajna u primarnoj reakciji. Kalpaini deluju zaštitnički, gde vezivanjem intracelularnih jona kalcijuma, smanjuju njihovo akutno toksično dejstvo, dok pri hroničnoj intoksikaciji aristolohijom nemaju značajan efekat u zaštiti ćelije. Kao posledica poremećaja funkcije mitohondrija pri hroničnom izlaganju toksinom, remeti se njena sposobnost za proizvodnjom bioenergije, i brzo nastupa ćelijska smrt po tipu nekroze. Postoje istraživanja koja ukazuju na mogućnost povećane ekspresije kalpaina u odgovoru ćelije na povećan oksidativni stres, što ima protektivnu ulogu u razvoju mitohondrijalnog oštećenja i ćelijske smrti [83, 179-181].

5.5 Pojava fibrotičnih markera u humanim tubulocitima nakon akutnog i hroničnog tretmana aristolohijskom kiselinom

Hronična intoksikacija aristolohijskom kiselinom karakteriše se sporom regeneracijom epitela, a često i pojavom tubularne atrofije i intesticijalne fibroze. Usled negativnog dejstva na rast samih ćelija [182], posledično se javlja usporena regeneracija tubula sa povećanom proliferacijom ne-target ćelija, fibroblasta, i razvojem fibroze [80].

Na osnovu proteomskih istraživanja homogenata humanih ćelija proksimalnih tubula (HK2 ćelije) nakon akutnog (72h) i hroničnog izlaganja (10, 30 i 60 dana) aristolohijskom kiselinom 1, i potvrdom dobijenih rezultata imunološkim analizama tretiranih HK2 ćelija, pronađene su značajno povišene vrednosti markera fibroze (fibronektin, vimentin, vinkulin, α -aktin glatkih mišića) nakon tretmana.

Fibronektin (FN1) je protein molekularne mase 262,6 kDa. Vezuje se za spoljašnju površinu ćelijske membrane, ali i za druge brojne komponente kao što su kolagen, fibrin, heparin, DNK i aktin. Učestvuje u procesu ćelijske adhezije, ćelijskog motiliteta, opsonizacije, oživljavanju rana i u organizaciji oblika ćelije. Anastelin vezuje fibronektin i indukuje nastanak fibrilne formacije. Superfibronektin je polimer fibronektina i pokazuje pojačano adhezivno svojstvo. Anastelin i superfibronektin inhibiraju rast tumora, angiogenezu i metastaziranje. Plazma FN1 je sekretovan od strane hepatocita. Ćelijski FN1 je produkavan od strane fibroblasta, epitelijalnih ćelija i drugih ćelija, a nalazi se u ekstracelularnom matriksu u formi fibrila. Posebne forme, Ugl-Y1, Ugl-Y2 i Ugl-Y3 pronađene su u urinu. Učestvuje u akutnom odgovoru ćelije na oštećenje; prilikom zapaljenskih reakcija koje ne uključuju aktivaciju specifičnog imunog odgovora i produkciju antitela [183, 184].

Vimentin (VIM) je fosfoprotein klase III intermedijalnih filamenata i molekularne mase 53,6 kDa. Pronađen je u brojnim ne-epitelnim, posebno u mezenhimnim ćelijama. Pojačano je eksprimiran u fibroblastima, nešto manje u T i B limfocitima, a gotovo da ga nema u ćelijama Burkittovog limfoma. Povišene vrednosti su prisutne u tumorskim hormonalno nezavisnim ćelijskim linijama (na primer kod karcinoma dojke). Učestvuje u procesima ćelijske deobe, gde je fosforilacija ovog proteina intenzivna [185, 186].

Vinkulin (VCL) je F-aktin vezujući protein molekularne mase 123,8 kDa, koji učestvuje u adheziji ćelije za celularni matriks i intraćelijsku adheziju. Značajan je i u očuvanju morfologije ćelije kao i u regulaciji ćelijskih pokreta. Aktivna forma ovog proteina učestuje i u prenosu signala kroz ćeliju u toku ovih procesa [187].

Dezmin je protein molekularne mase 53,5 kDa. Pripada klasi III intermedilajnih filamenata pronađenih u mišićnim ćelijama. Može je pojačano eksprimirati od strane epitelijalnih ćelija u stanjima hronične hipoksije [188].

Alfa-aktin glatkih mišića (ACTA2) je protein molekularne mase 42 kDa. Aktini su evolucijski visoko konzervativni proteini, uključeni su u regulaciju ćelijske motilnosti, i prisutni u svim eukariotskim ćelijama. Postoje tri aktivne izoforme kao što su alfa (mišićno tkivo), beta i gamma (u skoro svim ćelijama kao komponente citoskeleta) [189]. Prisustvo ACTA2 u lizatima epitelijalnih ćelija, znak je metaplastičnih promena (mezenhimna transformacija) [79, 80, 180, 190].

Značaj strukturnih promena u ekstracelularnom matriksu (gubitak E kaderina kao epitelijalnog markera, pojava kolagena I i III) u razvoju intesticijalne fibroze pri AA1 intoksikaciji još uvek je nedovoljno proučen. Nalaz 5% strukturno promenjenih epitelijalnih ćelija koje proizvode veliku količinu fibrotičnih markera (posebno vimentina, ACTA2, kolagena tipa I i III) pod dejstvom AA1 od strane nekih naučnika smatra se potencijalnim izvorom intesticijalnih fibroblasta. Aktivacija lokalnih fibroblasta i miofibroblasta kao odgovor tkiva na prisutno oštećenje ćelija u razvoju intesticijalne fibroze takođe nije isključena. AA intoksikacija tubulocita u eksperimentalnim ćelijskim modelima hronične AA1 intoksikacije rezultovala je gubitkom epitelijalnih markera i novom ekspresijom markera mezenhimne transformacije, kao i poremećajem strukture tubularne bazalne membrane (nagomilavanjem kolagena tipa I i III). Takve promene mogu teoretski objasniti nastanak tubulointesticijalne fibroze, progresivnog oštećenja bubrega i brzog razvoja terminalne bubrežne insuficijencije kod pacijenata sa nefropatijom aristolohijske kiseline (NAA). Aktivacija JNK/MAO kinaznog-Smad 3 signalnog puta je mehanizam kojim AA1 indukuje promene u tubularnim epitelijalnim ćelijama i posledično dovodi do pojave kolagena I i III u međućelijskom prostoru i razvoja renalne fibroze. Značajno povišene vrednosti TGF-beta prilikom AA1 intoksikacije u ćeliji direktno aktiviraju ovaj signalni put koji vodi ka razvoju fibrogeneze i ćelijske transformacije preko aktivacije p38 i povećane ekspresije profibrotičnih markera [79, 80, 180].

Dalja istraživanja su neophodna da bi se u potpunosti objasnio mehanizam fibrotične transformacije epitelijalnih ćelija pod dejstvom *Aristolohia-e*.

5.6 Specifični proteini u lizatu humanih tubulocita kao odgovor na prisustvo aristolohijske kiseline

Istraživanjem proteoma humanih tubulocita prilikom akutnog izlaganja ćelija mikromolarnim koncentracijama AA1 toksina pronađeno je značajno povišena ekspresija 6, a značajno snižena ekspresija 11 različitih proteina.

AA1 se metaboliše primarno u jetri i tubularnim ćelijama bubrega nitroredukcijom u *N*-hidroksi-aristolaktam 1. On formira ciklični *N*-acil-nitrenijum jon koji se kovalentno vezuje za egzocikličnu amino grupu purinske baze DNK.

Tako nastaju 7-(deoksi-adenozin-N₆-il)-aristolaktam-1 i 7-(deoksi-adenozin-N₆-il)-aristolaktam-2 (dA-AA1, dA-AA2) i 7-(deoksi-guanozin-N₂-il)-aristolaktam 2 (dG-AA2). Najzastupljeniji je dA-AA1. Važni enzimi koji učestvuju u aktivaciji AA1 nalaze se u citoplazmatskoj subcelularnoj frakciji ćelija (NAD(P)H:kvinon oksidoreduktaza (NQO1)), u mikrozomima hepatičnih ćelija (citohrom P450 (CYP) 1A1/2) i mikrozomima bubrežnih ćelija (NADPH:CYP reduktaza (POR)). Prostaglandin H sintetaza (ciklooksigenaza, COX1 i COX2) u ćelijama urotelijalnog epitela ima mogućnost aktivacije AA1. Najefikasnije metaboličko dejstvo ispoljava NQO1 [182, 191-193].

Poliformizam gena za NQO1 (genotip *NQO1**2/*2 predisponira razvoj tumora) ima značajnu ulogu u razvoju urotelijalnih maligniteta kod EN pacijenata. Aristolaktam se ne vezuje direktno za DNK lanac ako nije redukovan. Nizak nivo dA-AA1 u ćelijama bubrega eksperimentalnih životinja govori u prilog postojanja dodatnog metaboličkog puta aristolohije – aktivacija oksidazama (COX-1 i/ili COX-2), koje su značajno povišene u urotelijalnom tkivu. Acetilacija i sulfonacija nisu značajni mehanizmi metabolisanja AA1 u organizmu. Oksidacija AA1 je deo detoksikacionog puta ove kiseline. Tako su krajnji produkti, AA1a, konjugati *O*-glukuronid, *O*-acetat i *O*-sulfat estri, otkriveni u izlučenom urinu. Enzimske reakcije koje dovode do nastanka aristolaktama 1a i njegovih metabolita su čisto detoksifikacionog tipa. Nisu otkriveni njihovi DNK adukti. Hepatična CYP oksidiše i demetiliše (*O*-demetilacija) najveći deo AA1 u organizmu stvarajući AA1a. Njegova konjugacija sa glukuronidom pomoću enzima UDP-glukuronoziltransferaze stvara produkt koji se izlučuje putem mokraće. Osobe koje nose *CYP3A5**1 alel G6989 imaju nefunkcionalan enzim, što čini eliminaciju toksina iz organizma je usporenom. Enzim je posebno značajan u prvoj liniji zaštite organizma od dejstva toksina. AA1 može biti i aktivisana CYP-om pod anaerobnim uslovima, još uvek nepoznatim mehanizmom (dolazi do nitroredukcije), gde nastaju DNK adukti. CYP1A1 i CYP1A2 su najefikasniji u oksidaciji AA1, za razliku od ostalih enzima iz ove grupe, CYP1B1, CYP2C8, CYP3A4, CYP2B6 kao i citohroma b₅ [191].

AA može izazvati direktno oštećenje ćelija tubularnog epitela bubrega preko poremećaja stabilnosti mitohondrijane membrane. Značajniji toksični efekti se pripisuju njenim metabolitima. Stvaranje DNK adukta [193] može dovesti do maligne transformacije sa jedne strane, ali i nastanak ćelijski specifičnih alteracija na nivou transkripcije proteina i poremećaja normalnih ćelijskih funkcija. Potvrđeno je prisustvo DNK lezija kod pacijenata sa endemskom nefropatijom (EN), zdravih osoba koje žive na endemskim područjima [60, 194], kao i kod pacijenata sa urotelijalnim karcinomima [195]. Prisustvo DNK-adukta smatra se markerom prokuženosti, tj. dokazom da je osoba bila izlagana ovom kiselinom. Kao posledica nastaje mutacija tumor su-

presor gena *TP53* po tipu transferzije A:T→T:A [196]. Mutacija *TP53* gena, kao point mutacija, najverovatnije predstavlja početni stepen u razvoju tumora, jer mutirani gen gubi tumor supresivnu funkciju [197]. Specifična promena u strukturi gena identifikovana je na 139 kodonu egzona 5, po tipu iz AAG u TAG (Lys→Sop), što dovodi do prekomerne ekspresije mutiranog proteina. Još uvek nije utvrđeno da je upravo gen za ovaj protein specifično mesto delovanja AA1. Uloga tumor supresora TP53 u organizmu je ključna u određivanju sudbine ćelije nakon DNK oštećenja, pa njegova poremećena funkcija dovodi do daljih mutacija i razvoja tumora [194].

Progresija ćelijskog ciklusa je regulisana preko dve glavne kontrolne tačke locirane u G1/S ili G2/M fazi. Kada ćelija primi anti-proliferativni signal, kao što je na primer DNK oštećenje, refleksno se aktivira kontrolni povratni mehanizam koji inhibira ciklusnu progresiju preko ovih kontrolnih tačaka sve dok se ne sanira nastalo oštećenje. TP53 kontroliše transkripciju gena koji učestvuju u regulaciji apoptoze i DNK reparacije i na taj način štiti ćeliju od DNK oštećenja (npr. gen *CDKN1A*, koji kodira potentan inhibitor ćelijskog ciklusa koji reguliše progresiju ćelijskog ciklusa u G1 i G2 kontrolnu tačku kao odgovor na brojne stimulse; ovaj gen je jako eksprimiran usled prisustva AA1 preko aktivacije *PT53* gena). Između ostalog suprimira ekspresiju gena koji kodiraju citoskeletne proteine (*K-ALPHA-1*, *H2-ALPHA*, *TUBA-1* i *TUBA-3*). Međutim, vrednosti citoskeletnih proteina nisu bile značajno snižene u tretiranim HK2 ćelijama u odnosu na kontrolnu grupu (HK2 ćelije bez tretmana) tokom našeg eksperimenta. Što duže traje izlaganje dejstva toksinu i u većoj dozi, efekat postaje više *TP53* zavistan. Najveća up regulacija posredstvom *TP53* proteina detektovana je kod *KLF10* i *EGR1* gena. Veliki broj gena za histone je up regulisan (*HIST1H1C*, *HIST1H2AC*, *HIST1H3D*, *HIST1H3E*, *HIST1H4B* i *HIST1H4C*). U našoj studiji ovi literaturni podaci su potvrđeni. Veliki broj ćelija je ovim efektom zaključano u S fazi ćelijskog ciklusa pri dejstvu AA1. Aktivacija transkripcije gena za histone prisutna je u ćelijama u G1/S tranziciji i tokom S faze. Ovo zadržavanje se objašnjava (mada nema još uvek potpunih dokaza za to, samo je pretpostavka) nemogućnošću DNK polimeraza kompleksa da izvrši replikaciju i/ili transkripciju preko AA-DNK, koji efikasno blokiraju njeno dejstvo. Inhibicija DNK replikacije može uvesti ćeliju u apoptozu. To je neka vrsta zaštitnog mehanizma oštećene ćelije, i nije obavezno posredovana aktivacijom PT53 puta. Pretpostavlja se da nedostatak G1 aresta nastaje usled nemogućnosti ćelija da eksprimiraju potentni inhibitor G1/G2 ćelijskog ciklusa, CDKN1A. Akumulacija ovog inhibitora se javlja u ćeliji tek nakon dužeg delovanja toksina (nakon 48h) kada ćelija već uđe u S fazu ciklusa. Ali što je veće oštećenje DNK (usled nastajanja adukta) to veći broj ćelija ostaje zaključano u G1 fazi, jer posledično usled ovog defekta nivo proteina koji su zaduženi za prelazak u sledeću

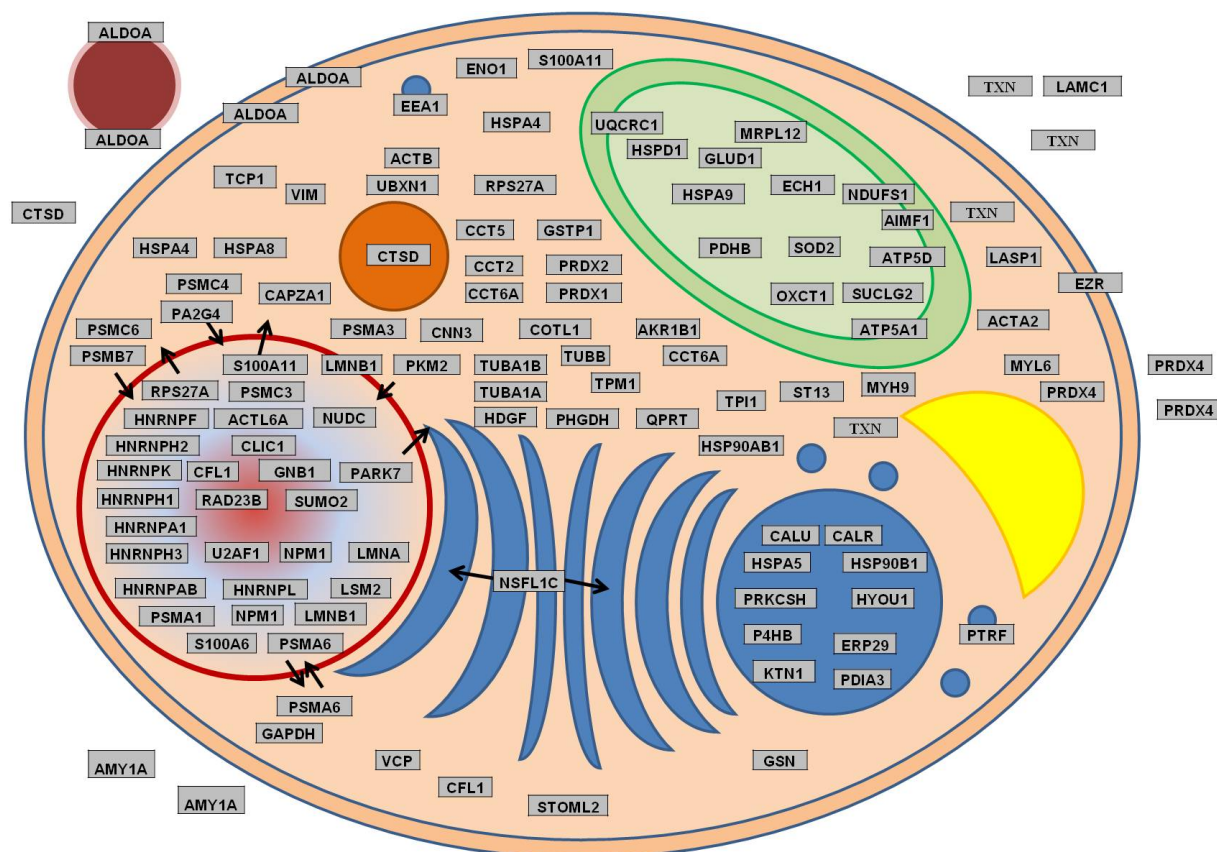
fazu nije dovoljan da bi do nje i došlo. Replikacija tako oštećene DNK može da dovede do stvaranja mutacija zaslužnih za malignu transformaciju ćelije. Naročito ako dovode do amplifikacije gena, kao i mutacije gena za TP53 protein [182, 194].

Još su dva proteina, koja učestvuju u procesima endocitoze, regulisana su pod dejstvom AA1: nukleoprotein, NECAP1 (smanjeno) i Ras-zavistan protein, RAB5A (povišeno regulisan). NECAP1 učestvuje u klaritin posredovanoj endocitozi, ali njegova funkcija nije do kraja razjašnjena. RAB5A, po funkciji je GTPaza, reguliše fuziju endozoma, ali njegova ključna uloga u receptor posredovanoj endocitozi još uvek nije razjašnjena. Promene i njihovoj ekspresiji smatraju se značajnim za ispoljavanje efekata AA1 intoksikacije [182, 194].

Najznačajniji podaci iz literature ukazuju da je povišena ekspresija proteina u lizatu HK2 ćelija nakon AA tretmana bila je prisutna kod ornitin aminotransferaze, sorbitol dehidrogenaze, alfa aktina, aspartoacilaze, 3-hidroksiizobutirat dehidrogenaze i peroksiredoksina 1. Snižena ekspresija bila je zabeležena kod ATP sintaze subjedinice beta, glutamat dehidrogenaze 1, beta aktina, regukalcina, glutamat-cistein ligaze regulatorna subjedinica, dihidropteridin reduktaze, hidroksilacil-koenzim A dehidrogenaze, proteina 1 voltažno-anjon zavisnog selektivnog kanala, prohibitina, adenilat kinaze izoenzima 4, i alfa-kristalina B lanca. Peroksiredoksin je bio značajno povišen u tkivu bubrega nakon administracije AA1, kao odbrana ćelije usled indukovano oksidativnog stresa. Najznačajniji detektovan protein koji je smanjeno ekspimiran u bubrežnom tkivu bio je regukalcin, protein sa značajnom ulogom u metabolizmu kalcijuma. Smatra se da tim mehanizmom, preko oslobađanja kalcijuma i njegovog ulaska u mitohondrije, AA1 dodatno kompromituje njenu funkciju, već delom oštećenu usled povišenog oksidativnog stresa. ATP sintaza, neophodna za produkciju adekvatne količine ATP-a u ćeliji, takođe je smanjeno ekspimirana, a sličan nalaz je prisutan i u ispitivanju ćelijskog proteoma brojnih kancera [180].

Na **slici 39** su prikazani identifikovani proteini u HK2 ćelijama i njihova lokalizacija u ćeliji nakon AA1 hroničnog tretmana. Većina identifikovanih proteina prisutna je u povišenoj koncentraciji kao odgovor ćelije na direktna ili indirektno indukovana oštećenja. Kvantitativnom analizom ekstrahovanih proteina iz AA1 tretiranih HK2 ćelija, ustanovili smo značajne razlike u njihovoj ekspresiji u odnosu na HK2 bez tretmana, OTA-HK2 ili AA1-OTA-HK2 ćelije. Dodatna potvrda rezultata imunološkim metodama izvršena je za one proteine koji direktno učestvuju u metaboličke promene nastale kao posledica prisustva aristolohije.

Ispitivanje toksičnih efekata na HK2 ćelije toksina aristolohijske kiseline 1 proteomskim istraživanjima potvrdilo je postojanje proteina specifičnih za metabolizam AA1 (Eef1A1, Ndfus1, Lamin-A/C).



Slika 39. Shematski prikaz ćelijske lokalizacije identifikovanih proteina u ćelijskom lizatu HK2 ćelija nakon hronične (1 mesec) intoksikacije aristolohijskom kiselinom. Proteini su imenovani njihovim genetskim imenima.

Elongacioni faktor 1-alfa 1 (EEF1A1) je protein molekularne mase 50 kDa, a učestvuje u vezivanju aminoacil-tRNK za A-mesto na ribozomima u toku aktivne sinteze proteina. Nalazi se u moždanom tkivu, placenti, plućima, jetri, bubregu i pankreasu. Posebno su povišene vrednosti pri AA1 indukovanom oksidativnom stresu i sintezi proteina koji su neophodni za adekvatnu antioksidativnu zaštitu [198].

NADH-ubikvinon oksidoreduktaza 75 kDa subjednica, mitohondrijalna forma (NDUFS1) je protein molekularne mase 79,5 kDa i deo mitohondrijalnog respiratornog kompleksa I na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Njegova ekspresija je povećana kao odgovor na povećane energetske potrebe (sinteza proteina u AA1 oksidativnom stresu) ćelije u patološkim stanjima [199].

Lamin A/C (LMNA) je nuklearni protein molekularne mase 70 kDa. Učestvuje u reorganizaciji nuklearnog materijala, organizaciji hromatina, nuklearne membrane i reorganizaciji telomera. Povišeno je ekspimiran u odgovoru na DNK oštećenje (prisustvo DNK adukta koji remete transkripciju gena), ali i kao odgovor na aktivaciju TP53. Učestvuje u G1 fazi ćelijske deobe. U G2 fazi se detektuje u malim količinama. Normalno se nalazi u jezru, i uvek je povišenje njegove ekspresije i akumulacije odgovor na prisutno oštećenje ćelije (oksidativni stres) i u procesima starenja [200, 201].

5.7 Ohratoksin A indukuje oksidativni stres pri hroničnom izlaganju humanih tubulocita

OTA indukuje oksidativno oštećenje ćelija, što je dokazano vitro i in vivo eksperimentima. Nastaju specifična oštećenja DNK (formiranje 8-OHdG) pod dejstvom reaktivnih vrsta kiseonika. Javljaju se i specifične lezije naslednog materijala po tipu kompletnog kidanja lanca [202]. Ove promene su posebno naglašene u ćelijama jetre i bubrega, gde je enzim koji učestvuje u reparaciji DNK, foraminido-piridin-glikozilaza, takođe oštećen procesima oksidacije ili direktnim toksičnim dejstvom OTA-e. U tkivu bubrega, geni čija je transkripcija povećana u odgovoru na oksidativni stres (u svojim promotornim regionima sadrže antioksidativni regulatorni element (ARE) koji prepoznaje transkripcioni faktor, nuklearni eritroidni faktor 2 p45 vezan faktor 2 (Nrf2) i promoviše njihovu transkripciju), usled dejstva OTA-e, značajno su smanjeno regulisani [203]. Smatra se da na taj način OTA smanjuje prirodnu antioksidativnu zaštitu ćelije. Iako je oksidativni stres je primećen u različitim tkivima, razvoj tumora javlja uglavnom u bubregu [204]. OTA indukuje i povećanu ekspresiju inducibilne azot oksid sintetaze (iNOS), što ukazuje i na indukciju nitrozativnog stresa. Stimulacija proizvodnje NO dovodi do daljeg oštećenja DNK [204].

Akutno izlaganje HK2 ćelija mikromolarnom dozom ohratoksina A (OTA) nije dovelo do značajnog razvoja oksidativnog stresa u našem eksperimentu. Hronično izlaganje HK2 OTA toksinom dovodi do značajnog razvoja oksidativnog stresa.

U eksperimentalnim modelima OTA intoksikacije u kulturi ćelija, oštećenje DNK struktura je, za razliku od AA1 koja gradi DNK-adukte, posledica oksidativnih promena kao indirektnog oštećenja. Nivo oštećenja naslednog materijala u direknoj je korelaciji sa jačinom indukovano oksidativnog stresa i posledičnom produkcijom reaktivnih kiseoničnih radikala. Oksidativni stres u patogenezi OTA ćelijskog oštećenja posledica je povećane produkcije kiseoničnih radikala sa jedne strane, kao i smanjene antioksidativne zaštite sa druge strane. OTA direktno oštećuje NADPH-citohrom P450 reduktazu, inicirajući procese lipidne peroksidacije. Direktno redukuje kvinon u formu semikvinona i hidrokvina. Tako remeti ovaj antioksidativni sistem zaštite, aktivirajući dalju redoks cikličnu reakciju i formiranje reaktivnih kiseoničnih radikala. Istraživanja toksičnih efekata OTA na mitohondrijalne strukture, pokazala su značajan uticaj OTA-e na respiratornu funkciju i procese oksidativne fosforilacije preko poremećaja integriteta mitohondrijalne membrane i inhibicije sukcinat posredovanog elektronskog transfera u respiratornom lancu u mikromolarnim koncentracijama. Nanomolarne koncentracije OTA-e nisu remetile integritet mitohondrijalne membrane, jer koncentracija toksina nije bila dovoljna da uzrokuje lipidnu peroksidaciju i mitohondrijalnu disfunkciju, pa je antioksidativna zaštita bila očuvana [205-207]. Takav rezultat je postignut i u toku ove studije.

Geni proteina koji učestvuju u antioksidativnoj zaštiti poseduju ARE u svojim promotor regionima. ARE motivi su prepoznati od strane transkripcionih faktora, nuklearnih eritroidnih faktora 2 p45-povezanih faktora 2 (Nrf2) [205]. Faktori aktiviraju transkripciju gena proteina koji učestvuju u detoksikaciji, zaštiti ćelije i proteine antioksidativne zaštite). OTA inhibira transkripciju ovog transkripcionog faktora abazičnim oštećenjem DNK strukture, kao i direktnim oštećenjem ovog proteina i na taj način utiče na smanjenje antioksidativne zaštite ćelije [208, 209].

Sa druge strane, OTA povećava ekspresiju inducibilne azot oksid sintaze (iNOS) i dovodi do nitrozativnog stresa. Nitrozativni stres je posledica povećane produkcije NO usled indukcije iNOS-e, smanjenja detoksifikacije NO usled deplecije glutationa, kao i usled povećane produkcije superoksid anjona kao posledica smanjenja SOD1 i SOD2 enzima u ćeliji. Najznačajnija posledica nitrozativnog oštećenja intracelularnih struktura je dalje oštećenje DNK struktura (pojava 8-nitro-guanina) i prisustvo većeg broja abazičnih lezija, kao i lipidna peroksidacija strukturnih makromolekula. Usled povećane propustljivosti oštećenih membrana za jone kalcijuma, poremećaj homeostaze ovog jona dovodi do dalje produkcije reaktivnih kiseoničnih radikala. Poremećaj u strukturi i propustljivosti ćelijske membrane dovodi do gubitka njenog integriteta i može imati za posledicu indukciju apoptoze ili nekroze [208, 210].

Upotreba antioksidanasa u predtretmanu ohratoksinom signifikantno je redukovala posledice oksidativnog oštećenja u eksperimentalnim modelima na humanom i animalnom materijalu [211-213].

5.8 Pojava markera fibroze u humanim tubulocitima pri akutnom i hroničnom izlaganju ohratoksinom A

Na osnovu proteomskih istraživanja homogenata humanih ćelija proksimalnih tubula (HK2 ćelije) nakon akutnog (72h) i hroničnog izlaganja (10, 30 i 60 dana) ohratoksinom, kao i potvrdom dobijenih rezultata imunološkim analizama tretiranih HK2 ćelija, pronađene su značajno povišene vrednosti markera fibroze (fibronektin, vimentin, vinkulin, α -aktin glatkih mišića) u lizatu HK2 ćelija nakon tretmana.

HK2 ćelije u kontaktu sa toksinima produkovale su značajno povećanu količinu ACTA2 proteina u odnosu na kontrolnu grupu prilikom akutnog i hroničnog eksperimenta tretmanom OTA-om. ACTA2 kao marker epitelne mezenhimne tranzicije i fibroze ukazuje na prisustvo ovih procesa.

Vrlo niske koncentracije OTA (u nanomolarnom rangu) u modelu hronične intoksikacije humanih proksimalnih tubulocita i humanih fibroblasta poreklom iz bubrežnog tkiva, uzroko-

vale su ćelijsku hipertrofiju, dok je veća koncentracija toksina izazivala nekrozu (sa posledičnom inflamatornom reakcijom okolnog tkiva i migracijom ćelija zapaljenja, pri dozama većim od 1 μ mola) i apoptozu ćelija (programirana ćelijska smrt uz pojavu DNK fragmentacije). Tubulociti su kao odgovor na toksin, počeli da proizvode kolagen tipa III kao i fibronektin, dok je nuklearni faktor NF- κ B bio izrazito povišen. Druga grupa naučnika je pokazala povišene vrednosti ACTA2 (pojava tranzicije iz epitelnog fenotipa u mezenhimalni fenotip), dezmina, kolagena tipa IV, prekomernu ekspresiju TGF- β , a smanjenje ekspresije gena za E kaderin, N kaderin i matriks metaloproteinazu 9. Povećanje količine kolagena objašnjeno je upravo smanjenjem aktivnosti matriks metaloproteinaza, čime je smanjena posttranslaciona modifikacija kolagena i njegova degradacija, sa posledičnim nakupljanjem u intrećelijskom prostoru i progresije bolesti ka razvoju fibroze bubrežnog korteksa [214]. S obzirom da je za preuzimanje OTA-e od strane ćelija potreban poseban mehanizam aktivnog transporta koji se nalazi samo u tubulima bubrega, vrlo male količine prostom difuzijom dospevaju do ostalih ćelija. Zato se malo verovatnim smatra nastanak fibroze i hroničnog tubulointesticijalnog nefritisa kao posledica direktne stimulacije fibroblasta od strane ovog toksina. Razvoj fibroze usled aktivacije proliferacije bubrežnih fibroblasta može se jedino objasniti opštim reparacionim mehanizmom usled prisustva nekrotičnih ili apoptotičnih tubulocita (direktnim delovanjem toksina na tubulocite pri većim, mikromolarnim dozama) i ožiljavanjem tkiva [215, 216].

Ispitivanjem uticaja OTA-e na aktivnost mitogen aktiviranih protein kinaza (MAPKs), može se delom objasniti mehanizam njegovog profibrotičnog dejstva. Aktivacija ovog puta ima za posledicu pojačanu aktivaciju i drugih protein kinaza, kao što su ERK, JNK i p38 regulatora koji sada indukuje transkripciju profibrotičnih markera (sekrecija kolagena) i ćelijski rast. Stalna aktivacija ovih signalnih puteva može dovesti do nekontrolisane regulacije proliferativne aktivnosti, intenzivne ćelijske deobe i razvoja tumora [217-219].

5.9 Specifični proteini u lizatu humanih tubulocita (HK2) kao odgovor na prisustvo ohratoksina A

OTA izaziva širok spektar toksičnih efekata u animalnim modelima, uključujući nefrotoksičnost, kancerogenost, teratogenost, neurotoksičnost i imunotoksičnost. OTA uzrokuje toksično oštećenje bubrega kod svih vrsta sisara. Glavni mehanizmi dejstva uključuju direktnu genotoksičnost (direktno oštećenje DNK strukture) i epigenetske efekte (indirektno oštećenje DNK). OTA oštećuje DNK direktnim putem u malom procentu, dok su njegovi reaktivni metaboliti izrazitog genotoksičnog efekta i sklonosti ka formiranju DNK-adukta. OTA inhibira sintezu proteina preko kompeticije sa fenilalaninom u reakciji koju katalizuje fenilalanin-

tRNK-sintaza. Inhibicija sinteze proteina se smatra primarnim efektom ovog toksina, što posledično dovodi do inhibicije sinteze DNK i RNK. Povećana je i aktivnost gena koji učestvuju u negativnoj regulaciji sinteze proteina, kao što je gen za prostaglandin F2 receptor negativni regulator i gen za eukariotski inducibilni 4E faktor vezujući protein 1. Nasuprot tome, gen za elongacioni faktor 1-alfa 1 (eEF1A-1), protein koji promoviše GTP-zavisno vezivanje amino-kiseline-tRNK na strani ribozoma u toku sinteze proteina, smanjeno je eksprimiran. Smanjena je i količina svih RNK struktura nakon dejstva toksina, što za posledicu ima isključivanje određenih gena iz funkcije. Preliminarni podaci su dokazali da OTA povećava aktivnost histon-deacetilase (HDAC) u tkivu bubrega. HDAC su odgovorni za deacetilaciju nukleozomalnih histona što dovodi do inhibicije transkripcije gena. HDAC proteini imaju veliki značaj u razvoju maligniteta. Generalno smanjenje RNK ekspresije u ispitivanim ćelijama postavlja hipotezu o specifičnom efektu OTA-e na posttranslacionu modifikaciju gena, i zahteva dalja ispitivanja u tom pravcu [220, 221].

Visoka selektivnost bubrega na dejstvo OTA-e posledica je preuzimanja ovog toksina od strane tubulocita aktivnim transportom. Značajno smanjenje ekspresije gena za transkripcioni faktor HNF4a uzrokuje smanjenu transkripciju gena za proteine koji učestvuju u ksenobiotičkom metabolizmu (što dovodi do smanjenja detoksikacione uloge ćelije i izlučivanje toksina iz organizma) i transportu (kao što su Oat1, zob-K1, i Oatp1, proteini koji učestvuju u selektivnom transportu OTA-e u ćeliju). Na taj način OTA direktno utiče na sopsveni metabolizam u tubulocitima, sprečavajući veće toksično oštećenje. Suprotno tome, OTA značajno povećava aktivnost NF-kB u ćeliji [204].

Poznato je da endogeni ili egzogeni ćelijski oksidansi aktiviraju transkripcioni faktor NF-kB što dovodi do transkripcije gena koji su uključeni u rast ćelija, regulatorne puteve i inhibiciju apoptoze. Stalna aktivacija NF-kB je povezana sa razvojem tumora. MAPKs su ključne komponente kaskadne signalizacije koje učestvuju u prenosu informativnog signala od ćelijske membrane do jedra. Ekstracelularnim signalom regulisane kinaze (ERKs), stres aktivirane protein kinaze (SAPK), C-SEP N-terminalne kinaze (PSP/JNK) i mitogen aktivirane protein kinaze (P38) su glavne kinaze koje kontrolišu mnoge ćelijske fiziološke procese. ERKs regulišu proliferaciju ćelija, dok JNK i P38 su značajne u stresnim situacijama i apoptozi. OTA podstiče fosforilaciju ERK1/2, PSP/JNK i P38, i na taj način aktivira ove puteve. Od ostalih proteina čija je ekspresija značajno poremećena pri izlaganju ćelija OTA-om, važno je spomenuti i regukalcin, neophodan u regulaciji intraćelijske homeostaze kalcijuma. U eksperimentalnim uslovima regukalcin je ispoljio tumor-supresivni efekat u tumoru jetre [217-219].

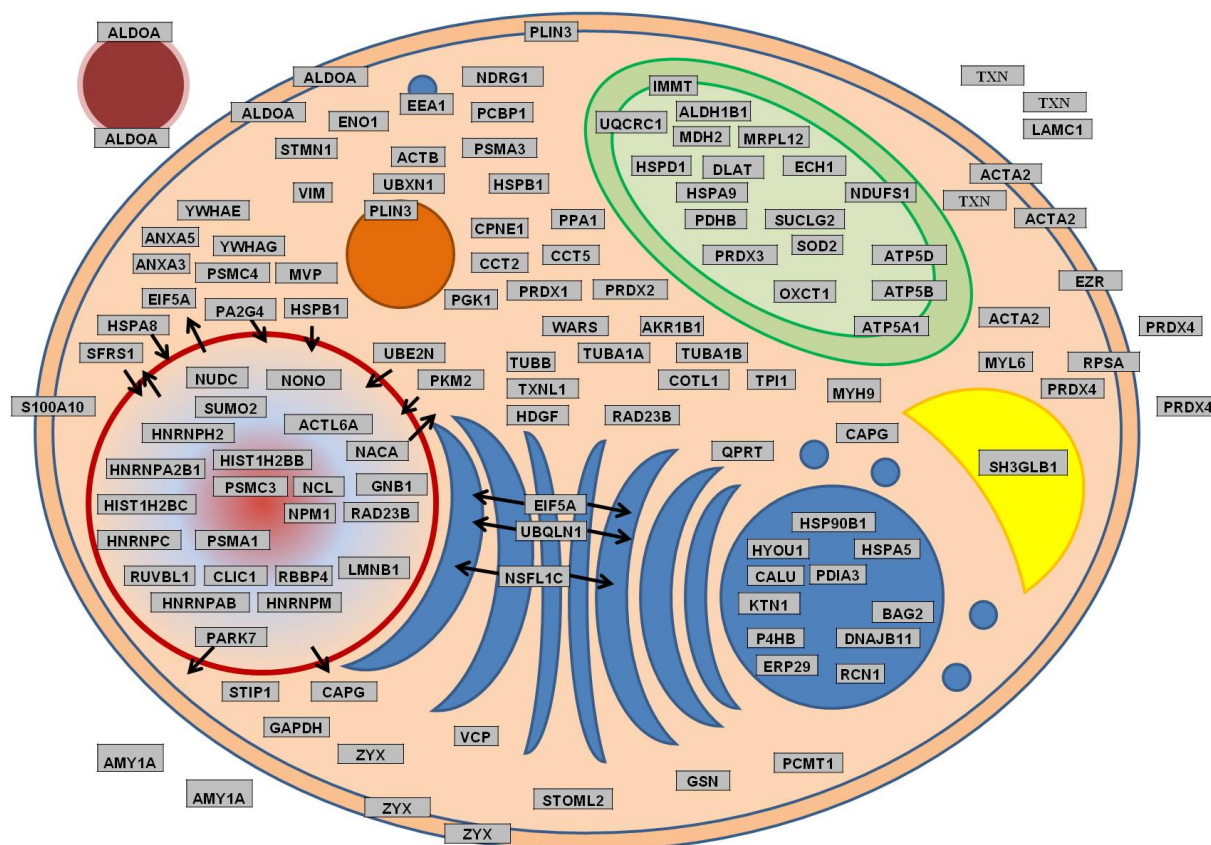
Regulacija pomenutih signalnih puteva postignuta je već u nanomolarnim dozama ovog toksina, što je u najvećem slučaju imalo za posledicu indukciju apoptoze. Tri glavne komponente su uključene u transdukciju apoptotičnog signala: BCL-2 familija proteina, mitohondrijalni regulatorni proteini i kaspaze. OTA smanjuje nivo BCL-2 proteina inhibicijom njihove sinteze, ali povećava aktivnost kaspaze 9 i kaspaze 3. Smatra se da i aktivacija apoptoze nastaje kao posledica DNK oštećenja i aktivacije *TP53* odgovora, kao i intraćelijska oštećenja nastala oksidativnim stresom, sa inicijalnim oštećenjem membrane mitohondrija i posledičnom aktivacijom kaspaze 9. Pored indukcije pro-apoptotičnih procesa, paradoksalno pronađen je povišen nivo iRNK za anti-apoptotične proteine, kao što su survivin i MCL-1, antiapoptotični član BCL-2 porodice [222, 223].

Ispitivanjem efekata toksina u nanomolarnim dozama, došlo se do zaključka da je glavni efekat toksičnog delovanja apoptoza, dok je inhibicija sinteze proteina slabije izražena. Teško je zaključiti da li je inhibicija sinteze proteina posledica ili uzrok apoptoze. Međutim, sa povećanjem doze ovog toksina u mikromolarnim veličinama, inhibicija sinteze proteina postaje evidentna u većini slučajeva, kao na primer, dovodi do evidentnog smanjenja tubulinskih traka u citoplazmi posmatrano pod elektronskim mikroskopom. Plato toksičnosti predstavlja koncentracija OTA-e od 6 mikrolarnih jedinica. Smatra se da se pri toj koncentraciji javljaju trajne promene i oštećenja u strukturi makromolekula, gde mehanizmi reparacije tkiva nisu u stanju da deluju a ćelija iscrpljuje sve mehanizme adaptacije. Apoptoza je tada glavni mehanizam eliminacije oštećene ćelije [224, 225].

Imunosupresivna aktivnost OTA-e karakteriše smanjenje veličine vitalnih organa kao što je timus, slezina i limfni čvorovi, depresije odgovora na prisustvo odgovarajućih antitela, promene u broju i funkcije imunih ćelija, kao i produkcije citokina. Imunotoksična aktivnost verovatno je posledica degenerativnih promena, nekroze i apoptoze, a usled inhibicije sinteze proteina [226].

Ispitivanje toksičnih efekata ohratoksina A na HK2 ćelije proteomskim istraživanjima potvrđeno je postojanje proteina specifičnih za metabolizam ovog toksina (Ube2N, ORP 150, Eif5A) i njihovog dejstva na samu ćeliju.

Ube2N je ubikvitin-konjugujući enzim E2 N, protein molekularne mase 17 kDa. Učestvuje u ubikvitinizaciji makromolekula i proteina na nivou endoplazmanskog retikuluma. Ovaj tip ubikvitinizacije ne zahteva dodatnu razgradnju proteina u proteazomima. Učestvuje u transkripcijskoj aktivaciji targetnih gena i tako kontroliše različite faze ćelijskog ciklusa u toku ćelijske deobe, ali i procesima diferencijacije. Učestvuje u reparaciji naslednog materijala i opštem preživljavanju ćelije nakon DNK oštećenja. Pojačano je eksprimiran kao odgovor na DNK oštećenje, što je slučaj kod intoksikacije ohratoksinom [227-229].



Slika 40. Shematski prikaz ćelijske lokalizacije identifikovanih proteina u ćelijskom lizatu HK2 ćelija nakon hronične (1 mesec) intoksikacije ohratoksinom A. Proteini su imenovani njihovim genetičkim imenima.

ORP 150 je hipoksijom up-regulisan protein 1 (HYOU1) molekularne mase 111,4 kDa. Neophodan je regulator protektivnog menahizma ćelije u stanjima koja dovode do smanjenog dopremanja kiseonika ćeliji ili usled nemogućnosti ćelije da adekvatno obavlja proces ćelijskog disanja. Takav impuls se javlja kod opsežnih oštećenja mitohondrijalnih struktura, kao i u slučaju intoksikacije ćelije OTA-om. Učestvuje u pakovanju i modifikaciji proteinskih lanaca u endoplazmatskom retikulumu, gde se i najvećim delom nalazi. Visoko je ekspimiran u ćelijama koje sadrže dobro razvijen endoplazmatski retikulum i sintetišu veliku količinu sekretornih proteina, kao što su ćelije jetre i pankreasa, dok je u vrlo malim količinama pronađen u moždanom tkivu i u bubregu. Visoke vrednosti prisutne su i u markofazima, kao i malignim ćelijama [109, 230].

Eif5A je eukariotski translacioni inicijalni faktor 5A-1, protein molekularne mase 16,8 kDa. Vezuje se za mRNK i učestvuje u regulaciji dužine peptidnog lanca u procesu translacije. Posebno je uključen u regulaciju metabolizma aktina i progresije ćelijskog ciklusa, preko aktivacije brojnih regulatornih puteva. Reguliše p53/TP53-zavisnu apoptozu. Takođe reguliše i TNF-alfa regulisanu apoptozu. Predominantno se nalazi u citoplazmi, ali usled potreba i indukcije ovih apoptotičnih puteva, prelazi u nukleus.

Nalazi se u velikim količinama u endotelnim ćelijama umbilikalne vene, ali posebno u brojnim kancerskim ćelijama. Postoji preporuka za korišćenje kao dobrog dijagnostičkog prediktora postojanja aberantne proliferacije u intraepitelijalnim neoplazijama vulve [231-233].

5.10 Aristolohijska kiselina i Ohratoksin A zajedno indukuju razvoj oksidativnog stresa i fibrozu pri akutnom i hroničnom izlaganju

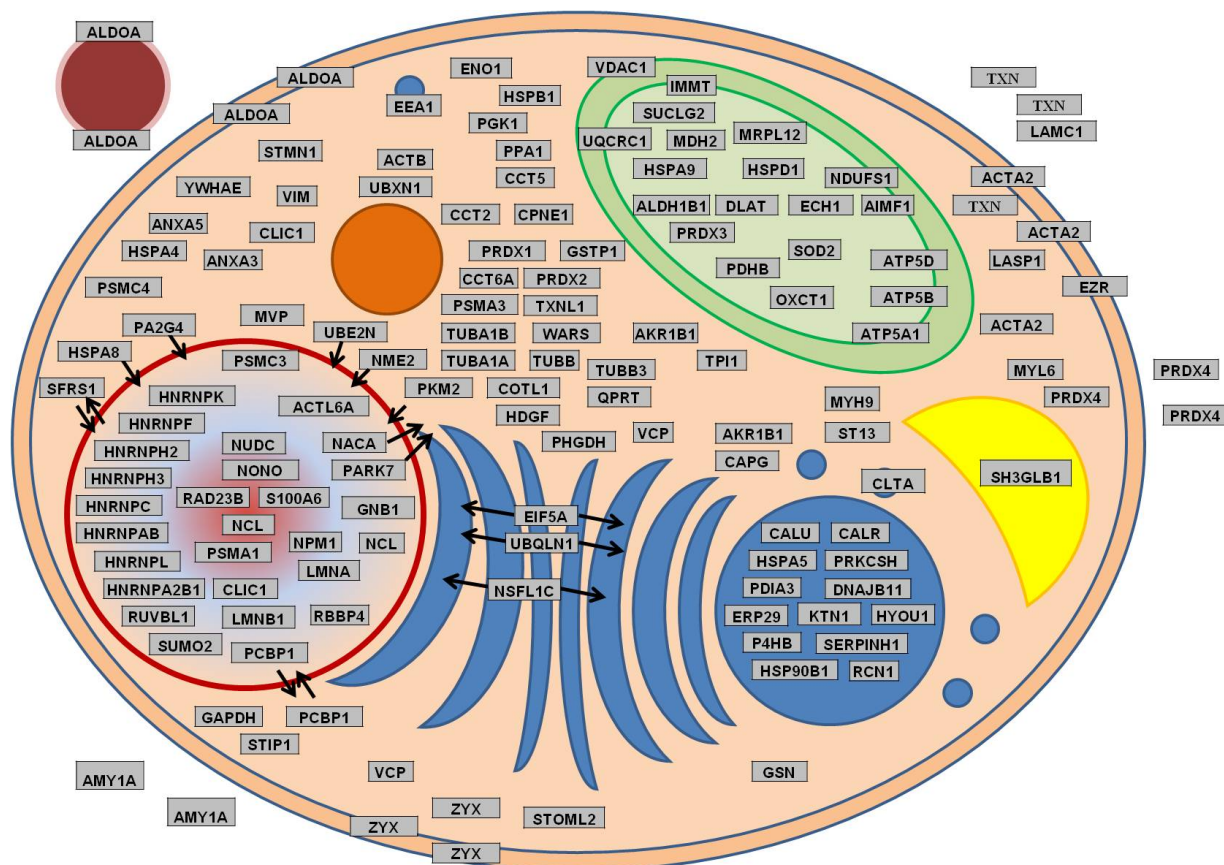
Akutni kombinovani tretman HK2 ćelija AA1 i OTA toksinima indukuje povećanu produkciju fibrotičnih markera (fibronektin, vimentin, vinkulin) i razvoj oksidativnog stresa (SOD2, PARK7). U toku dvomesečnog tretmana HK2 ćelija kombinacijom AA1 i OTA toksina, proteini koji učestvuju u odgovoru ćelije na postojanje oksidativnog stresa (SOD2, PARK7) kao i fibrotični markeri (fibronektin, vimentin, vinkulin) signifikantno su povišeni.

Mehanizmi kojima bi se mogli objasniti efekti kombinovanoog tretmana HK2 ćelija rastvorom AA1 i OTA-e nisu ponuđeni u dostupnoj literaturi. Brojne epidemiološke studije su opisivale moguću ulogu oba faktora u nastanku i razvoju tubulointesticijalnih lezija i pojave posledične fibroze. Usled nedostatka podataka o međusobnoj interakciji ovih toksina, ne možemo pripisati značajnu indukciju oksidativnog oštećenja humanih tubulocita njihovom eventualnom zajedničkom dejstvu. Zato se dobijeni rezultati mogu objasniti samo patogenetskim mehanizmima svakog toksina ponaosob, a oni ukazuju na povećanu produkciju kiseoničnih radikala (kod itoksikacije aristolohijom i ohratoksinom) ali i neadekvatnom indukcijom antioksidativne zaštite ćelije (ohratoksin inhibira sintezu proteina, ako i transkripciju specifičnih proteina).

Prisustvo markera fibroze je posledica dejstva i AA1-e i OTA-a. Marker tranzicije iz epitelnog u mezenhimni ćelijski tip je značajno povišen. HK2 ćelije u kontaktu sa toksinima proizvodile su povećanu količinu ACTA2 proteina u odnosu na kontrolnu grupu prilikom akutnog i hroničnog eksperimenta kombinovanim tretmanom AA1 i OTA. Efekat se može pripisati dejstvu oba toksina. Dalja istraživanja su neophodna da bi se potpunije objasnio mehanizam ovih promena.

5.11 Prisustvo specifičnih proteina u lizatu humanih tubulocita nakon njihovog izlaganja aristolohijskom kiselinom i ohratoksinom A

Distribucija identifikovanih proteina u HK2 ćeliji nakon hroničnog izlaganja kombinovanim tretmanu prikazana je na **slici 41**. Nakon kvantitativnih i kvalitativnih analiza proteoma ćelija nisu pronađeni proteini koji bi ukazivali na specifičnost intoksikacije HK2 ćelija kombinovanim tretmanom.



Slika 41. Shematski prikaz ćelijske lokalizacije identifikovanih proteina u ćelijskom lizatu HK2 ćelija nakon hronične (1 mesec) intoksikacije aristolohijskom kiselinom 1 i ohratoksinom A. Proteini su imenovani njihovim genetičkim imenima.

Ispitivanje toksičnih efekata na HK2 ćelije toksina aristolohijske kiseline 1 i ohratoksina A proteomskim istraživanjima potvrdilo je postojanje proteina specifičnih za metabolizam ovih toksina (AA1 (Eef1A1, Ndfus1, Lamin-A/C) ili OTA (Ube2N, ORP 150, Eif5A)) i njihovo dejstvo na samu ćeliju.

Imunoćelijska bojenja HK2 nakon aplikovanog tretmana u toku akutnog izlaganja toksinom, i primenom odgovarajućih antitela ukazala su na postojanje povišene ekspresije ORP 150, Ube2N i Eif5A kao markera OTA intoksikacije i lamina A/C kao markera AA1 intoksikacije. Medjutim, ekspresija Eef1A1 i Ndfus1 je bila značajno niska u odnosu na mono tretmane. Poznato je da direktno toksično dejstvo OTA-e utiče na smanjenje ovih proteina i na negativnu regulaciju ekspresije njihovih gena.

Dalja istraživanja su neophodna da bi se potpunije objasnio mehanizam ovih promena.

5.12 Markeri ćelijske intoksikacije aristolohijskom kiselinom i ohratokisnom u tkivu tumora gornjeg urotelijuma pacijenta sa i bez predhodno dijagnostifikovanim EN-om

Aristolohijska kiselina se smatra potencijalnim uzročnikom urotelijalnih tumora udruženih sa pojavom NAA, kao i urotelijalnih tumora nastalih kao komplikacija EN-a [46, 195]. Ovi tumori poseduju AA-karakteristične TP53 mutacije. Funkcionalne analize indukovanih promena u brojnim eksperimentima uključivale su različite mehanizme regulacije ćelijskih procesa: regulacija ćelijskog ciklusa, apoptoze, odgovora na prisustvo oksidativnog stresa, aktivacija imunog odgovora, ćelijska proliferacija i drugo [194].

Upravo poremećaj ravnoteže između aktivacije i inhibicije tumor supresor gena i protoonkogeno dovodi do nekontrolisane ćelijske deobe. Ali to je samo početak na dugom putu ka malignoj transformaciji ćelije. Mutacija TP53 tumor supresor gena je poznati uzrok nastanka preko 50% vrsta kancera. AA1 predominantno vezuje purinske strukture i uzrokuje promene po tipu transferzije, najčešće $A \rightarrow T$ tipa, što uzrokuje mutaciju $A:T \rightarrow T:A$ na kodonu 61 gena za TP53. Ove mutacije dovode do pojave nefunkcionalnog proteina koji se dodatno akumulira u nukleusu ćelije. Progresija i razvoj promena su spori u slučaju EN-a za razliku od NAA, gde se maligne komplikacije javljaju vrlo brzo [234].

Osim mutacija TP53 gena, nekontrolisana deoba ćelije se smatra posledicom prekomerne aktivacije nekih protoonkogeno, kao što je MYC onkogen. MYC gen je prekomerno ekspresiran u urotelijalnim tumorima, što je potvrđeno brojnim analizama. Genske analize humanog materijala su pokazale da prekomerna ekspresija gena za TP53, Rb1, Mdm2, Cdkn2a i MYC često prisutna baš u urotelijalnim karcinomima, što može biti od velikog značaja u analizi budućeg kliničkog markera oboljenja. Prekomerna ekspresija protoonkogeno MYC je nađena u ćelijama tumora urotelijuma. Sličan nalaz potvrđen je u eksperimentima na tubularnim ćelijama nakon izlaganja toksinu aristolohijske kiseline. MYC je normalna komponenta ćelija koja učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa, dok je njena prekomerna ekspresija ispoljena u tumorskom tkivu i tokom angiogeneze. Od ostalih onkogeno čija promena u ekspresiji gena značajna pri izlaganju ćelija ovim toksinom, prisutni su protoonkogeni FOS (smanjeno) i RAS (pojačano regulisan). Njihova prognostička uloga u AA1 karcinogenezi nije do kraja istražena. Dokazano je kod direktnog dejstva AA1 na ćeliju, prisustvo istih mutacija u genu za protoonkogen H-ras na njegovom 61 kodonu, što dovodi do prekomerne aktivacije gena. Ove mutacije se sreću kod velikog broja humanih malignih ćelija [191, 235].

OTA i njegovi metaboliti ne vezuju se za strukture naslednog materijala kovalentnim vezama, već stvaraju abazične lezije. OTA indukuje endoreduplikaciju, vrlo kondenzovanu metafazu i abnormalno razdvajanje sestrinskih hromatida u metafazi. Endoreduplikacija podrazumeva dve sukcesivne DNK sinteze bez ulaska ćelije u mitotičku deobu što uzrokuje formiranje diplohromozoma i posledičnoj mitotičkoj metafazi, i nastanku tetraploidnih i poliploidnih ćelija. Poliploidne ćelije su genetski nestabilne te dolazi do random gubitka hromozoma pri sledećoj deobi i razvoj aneuploidije. Aneuploidija je čest nalaz kod ćelija humanih tumora i karakteriše se visokim stepenom invazivnosti. Tetraploidne ćelije izlaze iz mitoze u odsustvu hromozomske segregacije ili razdvajanja citoplazme usled nedostataka ili inhibicije regulatornih mehanizama ćelijske deobe, inhibicije reorganizacije mikrotubula ili inhibicije DNK topoizomeraze II [203, 225].

Rane promene podrazumevaju baš takvu jednu sliku, pojavu ćelija sa kariomegalijom, ogromnim nukleusom smeštenim u sredini ćelije. Ćelije sa tetraploidijom predstavljaju rani korak u razvoju kancerogeneze, i formiranju aneuploidnih ćelija. OTA može i da blokira mitozu na prelasku iz metafaze u anafazu, što može rezultovati apoptozom ćelije ili prevremenim izlaskom iz mitoze. Aberantni prekid ciklusa i prevremeni izlazak iz mitoze, objašnjava se aktivacijom signala za preživljavanje ćelije, preko NF- κ B i EPK 1/2, koji sprečavaju nastanak apoptoze promocijom aberantnih puteva ćelijskog ciklusa. NF kapa B promoviše tranziciju iz G1 u S fazu i dozvoljava ponovni ulaz tetraploidne ćelije u ćelijski ciklus. Smatra se da je poremećaj u sintezi i produkciji regulatora ćelijskog ciklusa, pod uticajem OTA-e, zaslužan za ovakva usporavanja i nemogućnost vršenja adekvatne mitotičke deobe. Pojava indukovanog oksidativnog stresa u ćeliji pri intoksikaciji OTA-om, i oksidativno oštećenje naslednog materijala dodano može potencirati mutagene promene i nastanak maligne transformacije [88, 225].

Proteinski markeri karakteristični za metabolizam ispitivanih toksina (Eef1A1, Ndfus1, Lamin-A/C, Ube2N, ORP 150, Eif5A) na nivou ćelije, prisutni su u tkivu tumora gornjeg urotelijuma pacijenata sa EN-om, dok su tkiva tumora gornjeg urotelijuma pacijenata koji nisu predhodno oboleli od EN-a izražavala smanjenu pozitivnost na ispitivane markere. Nalaz ovih markera ukazuje na potencijalnu ulogu toksina u razvoju komplikacija EN-a po tipu malignih lezija, i ukazuje na značaj daljih istraživanja.

Nije postojala značajna razlika u ekspresiji proteina specifičnih za dejstvo određenog toksina (AA1 ili OTA) ispitivanih na tkivu tumora gornjeg urotelijuma pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovanog EN-a.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu proteomskih istraživanja uzoraka urina 360 pacijenata i zdravih ispitanika upotrebom 2-DE, masene spektrometrije i identifikacije proteina na osnovu detektovanih peptidnih spektara korišćenjem sistema pretrage u standardnim bazama podataka, i potvrđivanjem dobijenih rezultata imunološkim ispitivanjima, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Uspostavljene su proteinske mape urina pacijenata sa endemskom nefropatijom koje sadrže signifikantne razlike u poređenju sa urinom zdravih ispitanika i obolelih od dijabetesne nefropatije i akutne prerenalne bubrežne insuficijencije.
2. Utvrđene su signifikantne razlike u proteomu urina zdravih ispitanika koji žive na endemskim područjima u odnosu na zdrave ispitanike iz ne-endemskih regiona
3. Prisustvo markera glomerulskog oštećenja u urinu pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom značajno je povišeno u odnosu na urin EN pacijenata.
4. Marker glomerulskog oštećenja se značajnije javljaju u urinu EN pacijenata u odmaklom stadijumu bolesti u poređenju sa urinom zdravih dobrovoljaca iz endemskih područja, što pored oštećenja tubula ukazuje na dodatno oštećenje glomerula.
5. Identifikovano je šest jedinstvenih proteina (AMBP, APOH, B2M, LMAN2, POT1, SOD1) u uzorcima urina pacijenata sa endemskom nefropatijom, koji sa visokom specifičnošću i senzitivnošću metode diskriminišu EN od ostalih ispitivanih grupa, što ih čini dobrim dijagnostičkim markerima ovog oboljenja.
6. Nivo ekskretovanih specifičnih proteina AMBP, APOH, B2M, LMAN2, POT1 i SOD1 u urinu EN pacijenata signifikantno se povećava sa progresijom bolesti.

Na osnovu proteomskih istraživanja homogenata humanih ćelija proksimalnih tubula (HK2 ćelije) nakon akutnog (72h) i hroničnog izlaganja (10, 30 i 60 dana) toksinima aristolijske kiseline 1 i ohratoksina A, kao potencijalnim uzročnicima EN-a, i potvrdom dobijenih rezultata imunološkim analizama tretiranih HK2 ćelija i 60 tkivnih uzoraka tumora gornjeg urotelijuma pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovane EN, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ispitivanje toksičnih efekata na HK2 ćelije toksina aristolohijske kiseline 1 i ohratoksina A proteomskim istraživanjima potvrdilo je postojanje proteina specifičnih za metabolizam ovih toksina (AA1 (Eef1A1, Ndfus1, Lamin-A/C) ili OTA (Ube2N, ORP 150, Eif5A)) i njihovog dejstva na samu ćeliju.
2. Tokom akutnog izlaganja HK2 ćelija aristolohijskom kiselinom 1 (AA1) indukcija oksidativnog stresa (SOD2, PARK7) je signifikantna, kao i pojava fibrotičnih markera (FN1, VIM) u ćelijskom lizatu.
3. Akutno izlaganje HK2 ćelija ohratoksinom A (OTA) utiče na ekspresiju FN1 u ćelijskom lizatu, kao fibrotičnog markera ali bez značajne indukcije oksidativnog stresa.
4. Akutni kombinovani tretman HK2 ćelija AA1 i OTA toksinima indukuje povećanu produkciju fibrotičnih markera (FN1, VIM, VCL) i razvoj oksidativnog stresa (SOD2, PARK7).
5. Hronično izlaganje HK2 ćelija AA1 ili OTA toksinom dovodi do značajne ekspresije fibrotičnih markera (FN1, VIM) i razvoja oksidativnog stresa.
6. U toku dvomesečnog tretmana HK2 ćelija kombinacijom AA1 i OTA toksina, proteini koji učestvuju u odgovoru ćelije na postojanje oksidativnog stresa (SOD2, PARK7) kao i fibrotični markeri (FN1, VIM, VCL) signifikantno su povišeni.
7. HK2 ćelije u kontaktu sa toksinima produkovala su povećanu količinu ACTA2 proteina u odnosu na kontrolnu grupu prilikom akutnog i hroničnog eksperimenta pojedinačnim ili kombinovanim tretmanom AA1 i OTA. ACTA2, kao marker epitelno-mezenhimne tranzicije i fibroze, ukazuje na prisustvo ovih procesa.
8. Proteinski markeri karakteristični za metabolizam ispitivanih toksina (Eef1A1, Ndfus1, Lamin-A/C, Ube2N, ORP 150, Eif5A) na nivou ćelije prisutni su u tkivu tumora gornjeg urotelijuma EN pacijenata, dok su tkiva tumora gornjeg urotelijuma pacijenata koji nisu predhodno oboleli od EN-a imala smanjenu pozitivnost na ispitivane markere. Nalaz ovih markera ukazuje na potencijalnu ulogu toksina u razvoju komplikacija EN-a.
9. Nije postojala značajna razlika u ekspresiji proteina specifičnih za dejstvo određenog toksina (AA1 ili OTA) ispitivanih na tkivu tumora gornjeg urotelijuma pacijenata sa i bez predhodno dijagnostifikovanog EN-a.

6. LITERATURA

1. Oosterlinck, W., et al., *EAU guidelines on diagnosis and treatment of upper urinary tract transitional cell carcinoma*. Eur Urol, 2004. **46**(2): p. 147-54.
2. Oosterlinck, W., *Guidelines on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer*. Minerva Urol Nefrol, 2004. **56**(1): p. 65-72.
3. Oreopoulos, D., E. Thodis, and K.I. Paraskevas, *The promising future of long-term peritoneal dialysis*. Int Urol Nephrol, 2008. **40**(2): p. 405-10.
4. Oreopoulos, D.G., S. Ossareh, and E. Thodis, *Peritoneal dialysis: past, present, and future*. Iran J Kidney Dis, 2008. **2**(4): p. 171-82.
5. Stewart, J.H., M.R. McCredie, and S.M. Williams, *Geographic, ethnic, age-related and temporal variation in the incidence of end-stage renal disease in Europe, Canada and the Asia-Pacific region, 1998-2002*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(8): p. 2178-83.
6. Davidson, A. and C. Aranow, *Pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis*. Curr Opin Rheumatol, 2006. **18**(5): p. 468-75.
7. Satchell, S.C. and J.E. Tooke, *What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium?* Diabetologia, 2008. **51**(5): p. 714-25.
8. Makino, H., et al., *Role of apoptosis in the progression of glomerulosclerosis*. Contrib Nephrol, 1996. **118**: p. 41-7.
9. McGrogan, A., C.F. Franssen, and C.S. de Vries, *The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(2): p. 414-30.
10. Troyanov, S., et al., *Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 1061-8.
11. Swinkels, D.W., et al., *Glomerular filtration rate by single-injection inulin clearance: definition of a workable protocol for children*. Ann Clin Biochem, 2000. **37** (Pt 1): p. 60-6.
12. Robinson, B.E., *Epidemiology of chronic kidney disease and anemia*. J Am Med Dir Assoc, 2006. **7**(9 Suppl): p. S3-6; quiz S17-21.
13. Barnes, D.J. and G.C. Viberti, *Strategies for the prevention of diabetic kidney disease: early antihypertensive treatment or improved glycemic control?* J Diabetes Complications, 1994. **8**(3): p. 189-92.

14. Ritz, E., *Diabetic nephropathy*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2006. **17**(4): p. 481-90.
15. Fioretto, P., et al., *Renal protection in diabetes: role of glycemic control*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4 Suppl 2): p. S86-9.
16. Rathmann, W. and G. Giani, *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(10): p. 2568-9; author reply 2569.
17. Ritz, E. and R. Dikow, *Hypertension and antihypertensive treatment of diabetic nephropathy*. Nat Clin Pract Nephrol, 2006. **2**(10): p. 562-7.
18. Krolewski, A.S., J.H. Warram, and L.M. Laffel, *Genetic susceptibility to diabetic nephropathy*. Adv Nephrol Necker Hosp, 1992. **21**: p. 69-81.
19. Mogensen, C.E. and C.K. Christensen, *Blood pressure changes and renal function in incipient and overt diabetic nephropathy*. Hypertension, 1985. **7**(6 Pt 2): p. II64-73.
20. Bell, D.S., *Hypertension and diabetes: a toxic combination*. Endocr Pract, 2008. **14**(8): p. 1031-9.
21. Anderson, S., *Role of local and systemic angiotensin in diabetic renal disease*. Kidney Int Suppl, 1997. **63**: p. S107-10.
22. Kennefick, T.M. and S. Anderson, *Role of angiotensin II in diabetic nephropathy*. Semin Nephrol, 1997. **17**(5): p. 441-7.
23. Adler, S.G., et al., *Glomerular mRNAs in human type 1 diabetes: biochemical evidence for microalbuminuria as a manifestation of diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2001. **60**(6): p. 2330-6.
24. Remuzzi, G. and T. Bertani, *Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules?* Kidney Int, 1990. **38**(3): p. 384-94.
25. Sugiyama, S., et al., *Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11 Suppl 5**: p. 91-4.
26. Samuelsson, O., et al., *Apolipoprotein-B-containing lipoproteins and the progression of renal insufficiency*. Nephron, 1993. **63**(3): p. 279-85.
27. Attman, P.O., et al., *Dyslipoproteinemia in diabetic renal failure*. Kidney Int, 1992. **42**(6): p. 1381-9.
28. Chase, H.P., et al., *Cigarette smoking increases the risk of albuminuria among subjects with type I diabetes*. JAMA, 1991. **265**(5): p. 614-7.
29. Mason, R.M. and N.A. Wahab, *Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1358-73.

30. Greene, D.A., S.A. Lattimer, and A.A. Sima, *Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications*. N Engl J Med, 1987. **316**(10): p. 599-606.
31. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
32. Lee, T.S., et al., *Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5141-5.
33. Hunt, J.V., C.C. Smith, and S.P. Wolff, *Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose*. Diabetes, 1990. **39**(11): p. 1420-4.
34. Brownlee, M., A. Cerami, and H. Vlassara, *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. N Engl J Med, 1988. **318**(20): p. 1315-21.
35. Border, W.A. and N.A. Noble, *Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 181-8.
36. Twigg, S.M., et al., *Connective tissue growth factor/IGF-binding protein-related protein-2 is a mediator in the induction of fibronectin by advanced glycosylation end-products in human dermal fibroblasts*. Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1260-9.
37. Osterby, R., *Renal changes in the diabetic kidney*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(6): p. 1282-3.
38. Mogensen, C.E., et al., *Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria*. Lancet, 1995. **346**(8982): p. 1080-4.
39. Norden, A.G., et al., *Tubular proteinuria defined by a study of Dent's (CLCN5 mutation) and other tubular diseases*. Kidney Int, 2000. **57**(1): p. 240-9.
40. Praga, M. and E. Gonzalez, *Acute interstitial nephritis*. Kidney Int, 2010. **77**(11): p. 956-61.
41. Palm, F. and L. Nordquist, *Renal Tubulointerstitial Hypoxia: Cause and Consequence of Kidney Dysfunction*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. (u štampi)
42. Stefanovic, V. and M. Polenakovic, *Fifty years of research in Balkan endemic nephropathy: where are we now?* Nephron Clin Pract, 2009. **112**(2): p. c51-6.
43. Bukvic, D., et al., *Prevalence of Balkan endemic nephropathy has not changed since 1971 in the Kolubara region in Serbia*. Kidney Blood Press Res, 2007. **30**(2): p. 117-23.
44. Dimitrov, P.S., et al., *Is the incidence of Balkan endemic nephropathy decreasing?* Pathol Biol (Paris), 2002. **50**(1): p. 38-41.

45. Dimitrov, P.S., V.A. Simeonov, and A.D. Stein, *Balkan endemic nephropathy in Vratza, Bulgaria, 1964-1987: an epidemiologic analysis of population-based disease registers*. Eur J Epidemiol, 2001. **17**(9): p. 847-53.
46. Stefanovic, V., et al., *Fifty years of Balkan endemic nephropathy: challenges of study using epidemiological method*. Ren Fail, 2009. **31**(5): p. 409-18.
47. Radic, B., et al., *Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia*. Toxicol Lett, 1997. **91**(2): p. 105-9.
48. Fuchs, R. and M. Peraica, *Ochratoxin A in human kidney diseases*. Food Addit Contam, 2005. **22 Suppl 1**: p. 53-7.
49. Vrabcheva, T., et al., *Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(8): p. 2404-10.
50. Peraica, M., A.M. Domijan, and M. Saric, *Mycotoxic and aristolochic acid theories of the development of endemic nephropathy*. Arh Hig Rada Toksikol, 2008. **59**(1): p. 59-65.
51. Stefanovic, V., et al., *Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer*. Am J Nephrol, 2006. **26**(1): p. 1-11.
52. Arsenovic, A., et al., *Detection of renal dysfunctions in family members of patients with Balkan endemic nephropathy*. Am J Nephrol, 2005. **25**(1): p. 50-4.
53. Niagolova, N., et al., *Nitrogen species in drinking water indicate potential exposure pathway for Balkan Endemic Nephropathy*. Environ Pollut, 2005. **134**(2): p. 229-37.
54. Atanasova, S., et al., *MDR1 haplotypes modify BEN disease risk: a study in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy compared to healthy controls*. Nephron Exp Nephrol, 2004. **96**(1): p. e7-13.
55. Petronic, V. and M. Savin, *Apoptosis and p53 status of the upper urothelial carcinomas from Balkan endemic nephropathy regions*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16 Suppl 6**: p. 33-5.
56. Jelakovic, B., et al., *Antibodies to Tamm-Horsfall protein in endemic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14**(11): p. 2645-9.
57. Tatu, C.A., et al., *The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers*. Environ Health Perspect, 1998. **106**(11): p. 689-700.
58. Stefanovic, V., *Balkan endemic nephropathy: a need for novel aetiological approaches*. QJM, 1998. **91**(7): p. 457-63.
59. Toncheva, D., T. Dimitrov, and S. Stojanova, *Etiology of Balkan endemic nephropathy: a multifactorial disease?* Eur J Epidemiol, 1998. **14**(4): p. 389-94.

60. Nedelko, T., et al., *TP53 mutation signature supports involvement of aristolochic acid in the aetiology of endemic nephropathy-associated tumours*. Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 987-90.
61. Zivcic-Cosic, S., et al., *Urothelial cancer in patients with Endemic Balkan Nephropathy (EN) after renal transplantation*. Ren Fail, 2007. **29**(7): p. 861-5.
62. Long, D.T. and T.C. Voice, *Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan endemic nephropathy*. Croat Med J, 2007. **48**(3): p. 300-11.
63. Stefanovic, V. and Z. Radovanovic, *Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer*. Nat Clin Pract Urol, 2008. **5**(2): p. 105-12.
64. Lezaic, V., et al., *Comparison of kidney size between patients with Balkan endemic nephropathy and other kidney diseases*. Kidney Blood Press Res, 2008. **31**(5): p. 307-12.
65. Mantle, P.G., et al., *Does apoptosis cause renal atrophy in Balkan endemic nephropathy?* Lancet, 1998. **352**(9134): p. 1118-9.
66. Stefanovic, V., et al., *Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy: proposal by an international panel*. Ren Fail, 2007. **29**(7): p. 867-80.
67. Stefanovic, V., et al., *Increased urinary albumin excretion in children from families with Balkan nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2002. **17**(11): p. 913-6.
68. Cvoriscec, D., *Early diagnosis of endemic nephropathy*. Clin Chim Acta, 2000. **297**(1-2): p. 85-91.
69. Dimitrov, P.S., et al., *Increased blood pressure in adult offspring of families with Balkan endemic nephropathy: a prospective study*. BMC Nephrol, 2006. **7**: p. 12.
70. Djukanovic, L., et al., *Contribution to the definition of diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(12): p. 3932-8.
71. Dimitrov, P., et al., *Clinical markers in adult offspring of families with and without Balkan Endemic Nephropathy*. Kidney Int, 2006. **69**(4): p. 723-9.
72. Stefanovic, V., et al., *Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of Balkan endemic nephropathy, a worldwide disease*. Ren Fail, 2011. **33**(2): p. 176-83.
73. Imamovic, G., et al., *Microalbuminuria as a possible marker of risk of Balkan endemic nephropathy*. Nephrology (Carlton), 2008. **13**(7): p. 616-21.
74. Vanherweghem, J.L., et al., *Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs*. Lancet, 1993. **341**(8842): p. 387-91.
75. Vanhaelen, M., et al., *Identification of aristolochic acid in Chinese herbs*. Lancet, 1994. **343**(8890): p. 174.

76. Solez, K., et al., *Is "Chinese herbs nephropathy" a prejudicial term?* Am J Kidney Dis, 2001. **38**(5): p. 1141-2.
77. Stiborova, M., et al., *Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers.* Cancer Lett, 2005. **220**(2): p. 145-54.
78. Cheng, C.L., et al., *Chronic renal failure rats are highly sensitive to aristolochic acids, which are nephrotoxic and carcinogenic agents.* Cancer Lett, 2006. **232**(2): p. 236-42.
79. Wang, Y., et al., *TGF-beta1/Smad7 signaling stimulates renal tubulointerstitial fibrosis induced by AAI.* J Recept Signal Transduct Res, 2008. **28**(4): p. 413-28.
80. Yang, L., X. Li, and H. Wang, *Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis.* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(2): p. 445-56.
81. Wen, Y.J., et al., *Cytotoxicity of phenanthrenes extracted from Aristolochia contorta in human proximal tubular epithelial cell line.* Nephron Exp Nephrol, 2006. **103**(3): p. e95-e102.
82. Stiborova, M., et al., *Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acids: evidence for reductive activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2.* Chem Res Toxicol, 2001. **14**(8): p. 1128-37.
83. Wu, K., et al., *Genotoxic effect and nitrative DNA damage in HepG2 cells exposed to aristolochic acid.* Mutat Res, 2007. **630**(1-2): p. 97-102.
84. Shibutani, S., et al., *Selective toxicity of aristolochic acids I and II.* Drug Metab Dispos, 2007. **35**(7): p. 1217-22.
85. Tafani, M., et al., *Cytochrome c-dependent activation of caspase-3 by tumor necrosis factor requires induction of the mitochondrial permeability transition.* Am J Pathol, 2000. **156**(6): p. 2111-21.
86. Ferguson, L.R., *Role of dietary mutagens in cancer and atherosclerosis.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(4): p. 343-9.
87. Pfohl-Leszkowicz, A., et al., *New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor.* Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(9): p. 1131-46.
88. Pfohl-Leszkowicz, A. and R.A. Manderville, *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans.* Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(1): p. 61-99.
89. Petkova-Bocharova, T. and M. Castegnaro, *Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria.* IARC Sci Publ, 1991(115): p. 135-7.

90. Dirheimer, G., R. Rosenthaler, and E. Creppy, [*Mechanism of action of ochratoxin A, probable agent of endemic Balkan nephropathy*]. Bull Acad Natl Med, 1983. **167**(1): p. 67-74.
91. Martin, R.K., *Acute kidney injury: advances in definition, pathophysiology, and diagnosis*. AACN Adv Crit Care, 2010. **21**(4): p. 350-6.
92. Hoste, E.A., et al., *Epidemiology of acute kidney injury*. Contrib Nephrol, 2010. **165**: p. 1-8.
93. Choker, G. and J.B. Gouyon, *Diagnosis of acute renal failure in very preterm infants*. Biol Neonate, 2004. **86**(3): p. 212-6.
94. Devarajan, P., *Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury*. Semin Nephrol, 2007. **27**(6): p. 637-51.
95. Lameire, N., W. Van Biesen, and R. Vanholder, *Acute renal failure*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 417-30.
96. Muller, G.A., C.A. Muller, and H. Dihazi, *Clinical proteomics--on the long way from bench to bedside?* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(5): p. 1297-300.
97. Dihazi, H. and G.A. Muller, *Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(1): p. 39-50.
98. Dihazi, H., et al., *Whole cell profiling and identification of galectin-1 as a potential marker of renal cell carcinoma*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(2): p. 200-14.
99. Eltoweissy, M., et al., *Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress*. Mol Biosyst, 2011. **7**(4): p. 1277-88.
100. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
101. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
102. Dihazi, H., et al., *Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1445-58.
103. Dihazi, H., et al., *Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells: comparative proteomic approach*. J Proteome Res, 2009. **8**(12): p. 5497-510.
104. Jahn, O., et al., *Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2006. **386**(1): p. 92-103.
105. Werner, H.B., et al., *Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin*. J Neurosci, 2007. **27**(29): p. 7717-30.

106. Reumann, S., et al., *Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms*. Plant Cell, 2007. **19**(10): p. 3170-93.
107. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology, 1992. **24**: p. 145-9.
108. Pitarch, A., C. Nombela, and C. Gil, *Prediction of the Clinical Outcome in Invasive Candidiasis Patients Based on Molecular Fingerprints of Five Anti-Candida Antibodies in Serum*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(1): M11.
109. Dihazi, H., et al., *Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor*. J Proteomics, 2011. **74**(3): p. 304-18.
110. Soderland, P., et al., *Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposures*. Adv Chronic Kidney Dis. **17**(3): p. 254-64.
111. Schiller, A., et al., *Balkan endemic nephropathy: a still unsolved puzzle*. J Nephrol, 2008. **21**(5): p. 673-80.
112. Bamias, G. and J. Boletis, *Balkan nephropathy: evolution of our knowledge*. Am J Kidney Dis, 2008. **52**(3): p. 606-16.
113. Djukanovic, L., et al., *Open questions on Balkan nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16 Suppl 6**: p. 27-9.
114. Arlt, V.M., et al., *Is aristolochic acid a risk factor for Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer?* Int J Cancer, 2002. **101**(5): p. 500-2.
115. Miletic-Medved, M., A.M. Domijan, and M. Peraica, *Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia*. Wien Klin Wochenschr, 2005. **117**(17): p. 604-9.
116. Ivic, M., *[Etiology of endemic nephropathy]*. Lijec Vjesn, 1969. **91**(12): p. 1273-81.
117. Grollman, A.P., et al., *Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12129-34.
118. Wogan, G.N., et al., *Environmental and chemical carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 473-86.
119. Pfohl-Leskowicz, A., et al., *Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins*. Food Addit Contam, 2002. **19**(3): p. 282-302.
120. Toncheva, D., et al., *Urinary neopterin concentrations in patients with Balkan endemic nephropathy (BEN)*. Kidney Int, 2003. **64**(5): p. 1817-21.

121. Toncheva, D. and T. Dimitrov, *Genetic predisposition to Balkan endemic nephropathy*. Nephron, 1996. **72**(4): p. 564-9.
122. Stefanovic, V., et al., *Tubular marker excretion in children from families with Balkan nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2009. **24**(11): p. 2155-66.
123. Stefanovic, V., et al., *Beta 2-microglobulin in patients with Balkan nephropathy and in healthy members of their families*. Kidney Int Suppl, 1991. **34**: p. S21-6.
124. Saha, S., et al., *HIP2: an online database of human plasma proteins from healthy individuals*. BMC Med Genomics, 2008. **1**: p. 12.
125. Coon, J.J., et al., *CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(7-8): p. 964.
126. Bellei, E., et al., *Proteomic analysis of early urinary biomarkers of renal changes in type 2 diabetic patients*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(4): p. 478-91.
127. Ben Aneur, R., et al., *Proteomic approaches for discovering biomarkers of diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant. **25**(9): p. 2866-75.
128. Rao, P.V., et al., *Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 2007. **30**(3): p. 629-37.
129. Stefanovic, V., et al., *Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of balkan endemic nephropathy, a worldwide disease*. Ren Fail. **33**(2): p. 176-83.
130. Donadio, C., *Serum and urinary markers of early impairment of GFR in chronic kidney disease patients: diagnostic accuracy of urinary beta-trace protein*. Am J Physiol Renal Physiol. **299**(6): p. F1407-23.
131. Meijer, E., et al., *Association of urinary biomarkers with disease severity in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a cross-sectional analysis*. Am J Kidney Dis. **56**(5): p. 883-95.
132. Metzger, J., et al., *Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury*. Kidney Int. **78**(12): p. 1252-62.
133. Oetting, W.S., et al., *Urinary beta2-microglobulin is associated with acute renal allograft rejection*. Am J Kidney Dis, 2006. **47**(5): p. 898-904.
134. Batuman, V., *Possible pathogenetic role of low-molecular-weight proteins in Balkan nephropathy*. Kidney Int Suppl, 1991. **34**: p. S89-92.
135. Gussow, D., et al., *The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit*. J Immunol, 1987. **139**(9): p. 3132-8.

136. Reisinger, P., et al., *Human inter-alpha-trypsin inhibitor: localization of the Kunitz-type domains in the N-terminal part of the molecule and their release by a trypsin-like proteinase*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1985. **366**(5): p. 479-83.
137. Flynn, F.V., et al., *Urinary excretion of beta 2-glycoprotein-1 (apolipoprotein H) and other markers of tubular malfunction in "non-tubular" renal disease*. J Clin Pathol, 1992. **45**(7): p. 561-7.
138. Averna, M., et al., *Liver is not the unique site of synthesis of beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H): evidence for an intestinal localization*. Int J Clin Lab Res, 1997. **27**(3): p. 207-12.
139. Baumann, P., E. Podell, and T.R. Cech, *Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 8079-87.
140. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(3): p. 337-49.
141. Banci, L., et al., *Solution structure of Apo Cu,Zn superoxide dismutase: role of metal ions in protein folding*. Biochemistry, 2003. **42**(32): p. 9543-53.
142. Fiedler, K. and K. Simons, *A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins*. Cell, 1994. **77**(5): p. 625-6.
143. Neve, E.P., et al., *VIPL, a VIP36-like membrane protein with a putative function in the export of glycoproteins from the endoplasmic reticulum*. Exp Cell Res, 2003. **288**(1): p. 70-83.
144. Roos, A., et al., *Mannose-binding lectin and the kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(12): p. 3370-7.
145. Vlahou, A., et al., *Establishment of a European Network for Urine and Kidney Proteomics*. J Proteomics, 2008. **71**(4): p. 490-2.
146. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1058-70.
147. Pisitkun, T., R.F. Shen, and M.A. Knepper, *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13368-73.
148. Choudhury, D., M. Tuncel, and M. Levi, *Diabetic nephropathy -- a multifaceted target of new therapies*. Discov Med, 2010. **10**(54): p. 406-15.
149. Watanabe, H., et al., *Urinary excretion of type IV collagen as a specific indicator of the progression of diabetic nephropathy*. Nephron, 2000. **86**(1): p. 27-35.

150. Takahashi, M., *Increased urinary fibronectin excretion in type II diabetic patients with microalbuminuria*. Nippon Jinzo Gakkai Shi, 1995. **37**(6): p. 336-42.
151. Sharma, K., et al., *Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes*. Diabetes, 1997. **46**(5): p. 854-9.
152. Riser, B.L., et al., *Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report*. Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 451-8.
153. Kim, N.H., et al., *Plasma and urinary vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy in Type 2 diabetes mellitus*. Diabet Med, 2004. **21**(6): p. 545-51.
154. Jain, S., et al., *Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorder*. J Assoc Physicians India, 2005. **53**: p. 513-20.
155. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
156. Sharma, K., et al., *Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy*. Proteomics, 2005. **5**(10): p. 2648-55.
157. Castagna, A., et al., *Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads*. J Proteome Res, 2005. **4**(6): p. 1917-30.
158. Mischak, H., et al., *Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(5): p. 485-95.
159. Rossing, K., et al., *Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns*. Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 193-205.
160. Sharma, K., et al., *Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy*. Proteomics, 2005. **5**(10): p. 2648-55.
161. Kragh-Hansen, U., V.T. Chuang, and M. Otagiri, *Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin*. Biol Pharm Bull, 2002. **25**(6): p. 695-704.
162. Kalsheker, N., *Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene*. Biosci Rep, 1989. **9**(2): p. 129-38.
163. Bensi, G., et al., *Structure and expression of the human haptoglobin locus*. EMBO J, 1985. **4**(1): p. 119-26.
164. Liu, T., et al., *Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry*. J Proteome Res, 2005. **4**(6): p. 2070-80.
165. Kiernan, U.A., et al., *Comparative phenotypic analyses of human plasma and urinary retinol binding protein using mass spectrometric immunoassay*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(2): p. 401-5.

166. Yang, F., et al., *The vitamin D-binding protein gene contains conserved nucleotide sequences that respond to heavy metal, adipocyte and mitotic signals*. *Gene*, 1987. **54**(2-3): p. 285-90.
167. Chung, C.M., et al., *Biophysical analysis of normal transthyretin: implications for fibril formation in senile systemic amyloidosis*. *Amyloid*, 2001. **8**(2): p. 75-83.
168. Monaco, H.L., *Three-dimensional structure of the transthyretin-retinol-binding protein complex*. *Clin Chem Lab Med*, 2002. **40**(12): p. 1229-36.
169. Schwaeble, W., et al., *Human complement factor B: functional properties of a recombinant zymogen of the alternative activation pathway convertase*. *Immunobiology*, 1993. **188**(3): p. 221-32.
170. Perry, J.J., et al., *Contribution of human manganese superoxide dismutase tyrosine 34 to structure and catalysis*. *Biochemistry*, 2009. **48**(15): p. 3417-24.
171. Wojcik, M., I. Burzynska-Pedziwiatr, and L.A. Wozniak, *A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(28): p. 3262-88.
172. Honbou, K., et al., *The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(33): p. 31380-4.
173. Zhong, N., et al., *DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(30): p. 20940-8.
174. Xu, J., et al., *The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(9): p. 1231-41.
175. Thomas, K.J. and M.R. Cookson, *The role of PTEN-induced kinase 1 in mitochondrial dysfunction and dynamics*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(10): p. 2025-35.
176. Molina, H., et al., *Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2199-204.
177. Chevallet, M., et al., *Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37146-53.
178. Shang, F. and A. Taylor, *Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2011. (u štampi)
179. Mittler, R., *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. *Trends Plant Sci*, 2002. **7**(9): p. 405-10.

180. Wu, H.Z., et al., *Proteomics investigation on aristolochic acid nephropathy: a case study on rat kidney tissues*. Anal Bioanal Chem, 2011. **399**(10): p. 3431-9.
181. Pantopoulos, K., G. Weiss, and M.W. Hentze, *Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3781-8.
182. Li, Y., et al., *Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells in vitro*. Arch Toxicol, 2006. **80**(8): p. 524-32.
183. Kornblihtt, A.R., K. Vibe-Pedersen, and F.E. Baralle, *Human fibronectin: cell specific alternative mRNA splicing generates polypeptide chains differing in the number of internal repeats*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(14): p. 5853-68.
184. Pataki, A., E. Madarasz, and I. Kurucz, *Fibronectin quantification without antibodies: a bioassay for the detection of the gelatin-captured macromolecule*. J Biochem Biophys Methods, 2006. **68**(2): p. 113-26.
185. Eriksson, J.E., et al., *Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 6): p. 919-32.
186. Herrmann, H. and U. Aebi, *Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments*. Subcell Biochem, 1998. **31**: p. 319-62.
187. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
188. Li, Z.L., et al., *Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development*. Gene, 1989. **78**(2): p. 243-54.
189. Guo, D.C., et al., *Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1488-93.
190. Huang, N.F., et al., *Biophysical and chemical effects of fibrin on mesenchymal stromal cell gene expression*. Acta Biomater, 2010. **6**(10): p. 3947-56.
191. Stiborova, M., et al., *The role of biotransformation enzymes in the development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid: urgent questions and difficult answers*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2009. **153**(1): p. 5-11.
192. Allen, P.G. and J.M. Kolesar, *NAD(P)H: quinone oxidoreductase enhances proliferation inhibition by 4-hydroxytamoxifen*. Anticancer Res, 2002. **22**(3): p. 1475-80.
193. Lord, G.M., et al., *DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy*. Am J Kidney Dis, 2004. **43**(4): p. e11-7.

194. Slade, N., et al., *p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid: an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy*. *Mutat Res*, 2009. **663**(1-2): p. 1-6.
195. Nortier, J.L., et al., *Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi)*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(23): p. 1686-92.
196. Simoes, M.L., et al., *Gene expression profiles modulated by the human carcinogen aristolochic acid I in human cancer cells and their dependence on TP53*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **232**(1): p. 86-98.
197. Feldmeyer, N., et al., *Further studies with a cell immortalization assay to investigate the mutation signature of aristolochic acid in human p53 sequences*. *Mutat Res*, 2006. **608**(2): p. 163-8.
198. Bischoff, C., et al., *The human elongation factor 1 A-2 gene (EEF1A2): complete sequence and characterization of gene structure and promoter activity*. *Genomics*, 2000. **68**(1): p. 63-70.
199. Lazarou, M., et al., *Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(12): p. 4228-37.
200. Muralikrishna, B., et al., *Distinct changes in intranuclear lamin A/C organization during myoblast differentiation*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 22): p. 4001-11.
201. Moir, R.D. and T.P. Spann, *The structure and function of nuclear lamins: implications for disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(12-13): p. 1748-57.
202. Arbillaga, L., et al., *Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity*. *Mutagenesis*, 2007. **22**(1): p. 35-42.
203. Mally, A., et al., *Ochratoxin a causes DNA damage and cytogenetic effects but no DNA adducts in rats*. *Chem Res Toxicol*, 2005. **18**(8): p. 1253-61.
204. Marin-Kuan, M., et al., *A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat*. *Toxicol Sci*, 2006. **89**(1): p. 120-34.
205. Cavin, C., et al., *Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity*. *Toxicol Sci*, 2007. **96**(1): p. 30-9.
206. Gautier, J., et al., *Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes*. *Chem Res Toxicol*, 2001. **14**(1): p. 34-45.
207. Omar, R.F. and A.D. Rahimtula, *Possible role of an iron-oxygen complex in 4(S)-4-hydroxyochratoxin a formation by rat liver microsomes*. *Biochem Pharmacol*, 1993. **46**(11): p. 2073-81.
208. Marin-Kuan, M., et al., *Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms*. *Toxicol*, 2008. **52**(2): p. 195-202.

209. Delatour, T., et al., *Absence of 2'-deoxyguanosine-carbon 8-bound ochratoxin A adduct in rat kidney DNA monitored by isotope dilution LC-MS/MS*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52**(4): p. 472-82.
210. Soyoz, M., et al., *The effects of ochratoxin A on lipid peroxidation and antioxidant enzymes: a protective role of melatonin*. Cell Biol Toxicol, 2004. **20**(4): p. 213-9.
211. Sutken, E., et al., *Protective role of melatonin and coenzyme Q10 in ochratoxin A toxicity in rat liver and kidney*. Int J Toxicol, 2007. **26**(1): p. 81-7.
212. Meki, A.R. and A.A. Hussein, *Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2001. **130**(3): p. 305-13.
213. Creppy, E.E., I. Baudrimont, and M. Anne, *How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A*. J Toxicol Sci, 1998. **23 Suppl 2**: p. 165-72.
214. Sauvant, C., H. Holzinger, and M. Gekle, *The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(1-4): p. 125-34.
215. Sauvant, C., et al., *Exposure to nephrotoxic ochratoxin A enhances collagen secretion in human renal proximal tubular cells*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(1): p. 31-7.
216. Schwerdt, G., et al., *Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture*. Toxicology, 2007. **232**(1-2): p. 57-67.
217. Al-Anati, L. and E. Petzinger, *Immunotoxic activity of ochratoxin A*. J Vet Pharmacol Ther, 2006. **29**(2): p. 79-90.
218. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 239-67.
219. Cohen, S.M., et al., *Evaluating the human relevance of chemically induced animal tumors*. Toxicol Sci, 2004. **78**(2): p. 181-6.
220. Dai, J., et al., *Detection and characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A*. Chem Res Toxicol, 2002. **15**(12): p. 1581-8.
221. Brow, M.E., et al., *Photochemically catalyzed reaction of ochratoxin A with D- and L-cysteine*. Photochem Photobiol, 2002. **76**(6): p. 649-56.
222. Mally, A. and W. Dekant, *Mycotoxins and the kidney: modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(4): p. 467-78.
223. Gekle, M., et al., *Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(3): p. 837-44.

-
224. Horvath, A., et al., *Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line*. *Toxicol*, 2002. **40**(3): p. 273-82.
225. Kamp, H.G., et al., *Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells*. *Toxicology*, 2005. **206**(3): p. 413-25.
226. Hanif, N.Q., et al., *Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix Plus)*. *Br Poult Sci*, 2008. **49**(5): p. 632-42.
227. Habelhah, H., et al., *Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB*. *EMBO J*, 2004. **23**(2): p. 322-32.
228. Pruneda, J.N., et al., *Ubiquitin in motion: structural studies of the ubiquitin-conjugating enzyme approximately ubiquitin conjugate*. *Biochemistry*, 2011. **50**(10): p. 1624-33.
229. Kobayashi, J., et al., *Current topics in DNA double-strand break repair*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2008. **49**(2): p. 93-103.
230. Stojadinovic, A., et al., *HYOUI/Orp150 expression in breast cancer*. *Med Sci Monit*, 2007. **13**(11): p. BR231-239.
231. Taylor, C.A., et al., *Eukaryotic translation initiation factor 5A induces apoptosis in colon cancer cells and associates with the nucleus in response to tumour necrosis factor alpha signalling*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(3): p. 437-49.
232. Park, M.H., et al., *Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes*. *Amino Acids*, 2010. **38**(2): p. 491-500.
233. Li, C.H., et al., *eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e9942.
234. Stiborova, M., et al., *Contribution of biotransformation enzymes to the development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid: urgent questions, difficult answers*. *Interdiscip Toxicol*, 2008. **1**(1): p. 8-12.
235. Arlt, V.M., M. Stiborova, and H.H. Schmeiser, *Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review*. *Mutagenesis*, 2002. **17**(4): p. 265-77.

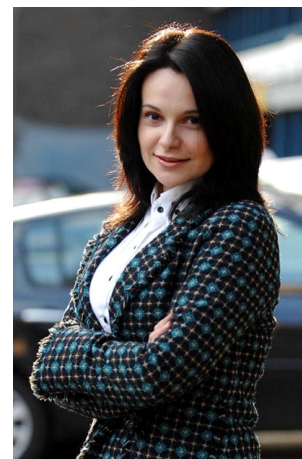
BIOGRAFIJA

Osnovni podaci

Ivana Pešić

Datum i mesto rođenja: 25. juli 1980. godine u Nišu

Naučna oblast i uža specijalnost: molekularna medicina
patofiziologija



Obrazovanje

Naziv završenog fakulteta: Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu
Studijska grupa – medicina
03. jul 2006. sa opštim uspehom 9,16 u toku studija
ocena 10 na diplomskom ispitu

Stipendije

1. Stipendija Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije (1999-2005)
2. Internacionalna stipendija UNESCO/L'oreal fondacije za mlade žene u nauci (2009-2011) za usavršavanje naučno-istraživačkog rada u laboratoriji za proteomska istraživanja instituta za nefrologiju i reumatologiju UMG, Getingen, Nemačka

Nagrade

1. Nagrada Evropskog pokreta u Srbiji i Ambasade Austrije u Beogradu za 200 najboljih studenata Univerziteta u Srbiji, 2006.
2. Zahvalnica Medicinskog fakulteta univerziteta u Nišu za postignute rezultate na 18. Evropskoj studentskoj konferenciji u Berlinu, decembar 2007.
3. Nosilac prvog Srpskog pasoša, nagrada Vlade Republike Srbije, maj, 2008.
4. Priznanje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu kao autoru najboljeg naučnog rada povodom proslave 48 godina postojanja i rada Medicinskog fakulteta u Nišu, 17.10.2008.
5. UNESCO/L'oreal Co-sponsored International fellowships for Young Women in Life Sciences 2009, Paris, France 05.03.2009.
6. Nagrada opštine Mediana za dostignuća u oblasti biomedicinskih nauka, Niš, 10.10.2009.

Rezultati naučno-istraživačkog rada**Izabrane publikacije:**

- **Pešić I**, Krstić M, Pavlović M, Ilić D, Dimitrios K. Hormonska senzitivnost tumora kod bolesnica sa rakom dojke. *Acta Medica Medianae* 2007; 46(2): 25-30.
- **Pešić I**, Janković-Veličković Lj, Stokanović D, Dimov I. Urinary and Tissue Biomarkers in Early Detection of Upper Urothelial Tract Cancer. *Facta Universitatis* 2007; 14(2): 47-52.
- Dimov I, **Pešić I**, Janković-Veličković Lj. Urinary and tissue proteomics of urothelial cancer. *Acta facultatis medicae Naissensis* 2008; 25(2): 75-80.
- Petrović V, Jovanović I, **Pešić I**, Stefanović V. Role of stem cells in kidney repair. *Renal Failure* 2010; 32(10): 1237-1244.
- Janković Veličković, L., Z. Dolićanin, Hattori T, **Pešić I**, Djordjević B, Stojanović M, Stanković J, Visnjić M, Stefanović V. (2010). "Divergent Squamous Differentiation in Upper Urothelial Carcinoma—Comparative Clinicopathological and Molecular Study." *Pathology & Oncology Research* 2010: 1-5.
- **Pešić I**, Dihazi GH, Müller GA, Jahn O, Hoffmann M, Eltoweissy M, Koziolok M, Dihazi H. Short-time increase of glucose concentration in PDS results in extensive removal and high glycation level of vital proteins during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011; 1-10.
- Stefanović V, Djukanović L, Čukuranović R, Bukvić D, Ležaić V, Marić I, Ogrizović SS, Jovanović I, Vlahović P, **Pešić I**, Djordjević V. Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of balkan endemic nephropathy, a worldwide disease. *Renal Failure* 2011; 33(2):176-83.
- Dolićanin Z, Janković Veličković Lj, Djordjević B, Višnjić M, **Pešić I**, Ristić A, Marjanović V. Expression of regulatory proteins and proliferative activity in relation to phenotypic characteristics of upper urothelial carcinoma. *Vojnosanitetski pregljed* 2011; in press.
- **Pešić I**, Stefanović V, Mueller GA, Mueller CA, Čukuranović R, Jahn O, Bojanić V, Koziolok M, Dihazi H. Identification and validation of six proteins as markers for endemic nephropathy. *Journal of Proteomics* 2011; in press.

Izabrana saopštenja na skupovima od nacionalnog i internacionalnog značaja:

1. **Pešić I**, Baumann C, Dihazi GH, Mueller GA, Dihazi H. Impact of dialysis membrane type on vital protein removal during hemodialysis: a proteomics approach. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) 26-29.09.2009. Georg-August-Universität Göttingen, Nemačka
2. **Pešić I**, Dihazi GH, Streich JH, Hoffmann M, Mueller GA, Dihazi H. Proteome analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) eluates: high glucose concentration results in increased removal of vital proteins. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) 26-29.09.2009. Georg-August-Universität Göttingen, Nemačka
3. Gansz M, **Pešić I**, Streich JH, Dihazi GH, Koziolok M, Mueller GA, Dihazi H. The impact of urine protein depletion on the improvement of 2-DE analysis in case of diabetic nephropathy. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) 26-29.09.2009. Georg-August-Universität Göttingen, Nemačka
4. **Pešić I**, Stefanović V, Mueller GA, Čukuranović R, Jahn O, Bojanić V, Dihazi H. Proteomic analysis of urine samples from patients with Balkan endemic nephropathy. EuroKUP COST Meeting – 20-21.03.2010. Rotterdam, Holandija
5. **Pešić I**, Stefanović V, Mueller GA, Čukuranović R, Jahn O, Bojanić V, Dihazi H. Proteome analysis of urine samples from patients with Balkan endemic nephropathy. XLVII ERA-EDTA Congress II DGfN Congress, 25-28.06.2010. Minhen, Nemačka
6. **Pešić I**, Baumann C, Dihazi GH, Mueller GA, Dihazi H. Proteomics analysis of hemodialysate revealed advantage of dialysis cellulose membranes in holding back vital proteins. XLVII ERA-EDTA Congress II DGfN Congress, 25-28.06.2010. Minhen, Nemačka
7. **Pešić I**, Dihazi GH, Jahn O, Hoffmann M, Mueller GA, Dihazi H. Proteome analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) eluates: high glucose concentration results in increased removal and high glycation level of vital proteins. XLVII ERA-EDTA Congress II DGfN Congress, 25-28.06.2010. Minhen, Nemačka
8. **Pešić I**, Stefanović V, Mueller GA, Čukuranović R, Jahn O, Bojanić V, Dihazi H. Balkan endemic nephropathy: urine protein pattern as a potential diagnostic biomarker. Human Proteome Organisation HUPO 2010, 9th Annual World Congress, 19-23 September, 2010. Sidnej, Australija

PATOFIZIOLOŠKI ASPEKTI GLOMERULSKIH I TUBULOINTESTICIJSKIH BUBREŽNIH OBOLJENJA: PROTEOMSKI PRISTUP

Sažetak

Uvod: Bubrežna oboljenja predstavljaju jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice. Endemska nefropatija (EN) je hronična tubulointesticijska nefropatija sa neprimetnim početkom i sporim razvojem terminalne bubrežne slabosti. Pravi uzrok nastanka bolesti još uvek nije poznat iako se istražuje značaj nasleđivanja, dejstvo činioca životne sredine (aristolohijska kiselina, mikotoksin), kao i prisustvo poremećaja imunog sistema.

Cilj istraživanja je utvrđivanje kvalitativnih i kvantitativnih razlika belančevina u mokraći pacijenata sa endemskom nefropatijom, dijabetesnom nefropatijom, akutnim prerenalnim bubrežnim oštećenjem, kao utvrđivanje njihovog značaja u dijagnostici oboljenja. Ispitivani su i efekti aristolohijske kiseline 1 i ohratoksina A na humane tubulocite pri akutnom i hroničnom izlaganju sa ciljem utvrđivanja mehanizama oštećenja bubrega, kao i potencijanih biomarkera.

Metode: U toku istraživanja korišćena je proteomska tehnologija, a rezultati su potvrđeni Western blot-om, dot blot-om, imunofluorescentnim i imunohistohemijskim analizama ćelija i tkiva.

Značaj: Upotreba proteomskih tehnologija pri analizi belančevina u mokraći pacijenata i zdravih ispitanika donosi nova saznanja sa ciljem da se identifikuju potencijalni dijagnostički i prognostički markeri oboljenja. Ova studija pokazuje prisustvo značajnih razlika u sastavu proteina ispitanika, koje se mogu koristiti kao diferencijalno dijagnostički parametri. Ispitivanja efekata toksičnosti aristolohijske kiseline 1 i ohratoksina A na humanim tubulocitima doprinose boljem razumevanju patofizioloških mehanizama nastanka bubrežnih bolesti, prvenstveno razjašnjenju molekularnih mehanizama koji leže u osnovi nastanka i razvoja endemske nefropatije i njenih komplikacija.

PATHOPHYSIOLOGY OF GLOMERULAR AND TUBULOINTERSTITIAL KIDNEY DISEASES: PROTEOMIC APPROACH

Summary

Introduction: Kidney diseases are the biggest health problem nowadays. Endemic nephropathy (EN) is a chronic tubulointerstitial kidney disease, undetectable at the beginning and with slow development to terminal renal failure. The real cause of the disease is still not known. Although the importance of inheritance is underlined, the effects of environmental factors (aristolochic acid, a mycotoxin) and the presence of disorders of the immune system are more likely to be involved in disease pathway.

Aim: We aimed to establish qualitative and quantitative differences of proteins in urine of patients with the endemic nephropathy, diabetic nephropathy, acute prerenal kidney injury, and their importance in the diagnostics. The acute and chronic effects of aristolochic acid 1 and ochratoxin A on tubulocytes are important for establishing the mechanisms of kidney damage and the potential biomarkers.

Methods: Proteomic technology was used, and the results were confirmed by Western blot, dot blot, immunofluorescence and immunohistochemistry analyses of cells and tissue samples.

Importance: The use of proteomic technologies of urine proteins in patients and healthy controls gives a new data for the identification of diagnostic and prognostic markers of kidney damage. This study shows the presence of significant differences in the proteins of the respondents, which can be used as diagnostic and differential diagnostic parameters. Study of toxic effects of aristolochic acid 1 and ochratoxin A permitted a better understanding of the mechanisms of kidney disease, but first of all, a better expansion of molecular pathway in the initiation and during development of endemic nephropathy and associated urothelial cancer.