

# Djelovanje kofeina pri nastanku oksidativnog oštećenja i kristalizacije u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK1

---

Cindrić, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:244345>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Anita Cindrić**

**DJELOVANJE KOFEINA PRI  
NASTANKU OKSIDATIVNOG  
OŠTEĆENJA I KRISTALIZACIJE U  
STANIČNOM MODELU OKSALATNE  
UROLITIJAZE PROKSIMALNIH  
BUBREŽNIH TUBULA (LLC-PK TIP I)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Anita Cindrić**

**DJELOVANJE KOFEINA PRI  
NASTANKU OKSIDATIVNOG  
OŠTEĆENJA I KRISTALIZACIJE U  
STANIČNOM MODELU OKSALATNE  
UROLITIJAZE PROKSIMALNIH  
BUBREŽNIH TUBULA (LLC-PK TIP I)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Martina Smolić, dr. med.

Rad ima 38 listova, 3 tablice i 19 slika.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Smolić, dr. med. na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Ovaj rad izrađen je na Medicinskom fakultetu Osijek te ovom prilikom zahvaljujem svim djelatnicima na iskazanoj strpljivosti, razumijevanju i pomoći tijekom istraživanja. Posebno zahvaljujem asistentici Vjeri Ninčević, dr. med. čija je pomoć bila nemjerljiva, njezina podrška i razumijevanje potpuni i bez koje ovaj rad ne bi bio moguć niti ostvaren. Veliko hvala Tei Omanović, dr. med. i doc. dr. sc. Tomislavu Kizivatu, dr. med., koji je svojim sugestijama uvelike pomogao pri rješavanju konkretnih problema.

Najveću zaslugu i neizmjernu zahvalnost za sve što sam postigla pripisujem svojim roditeljima i sestri koji su mi omogućili studiranje, podržavali me i vjerovali u mene do samog kraja.

Ovaj rad posvećujem svima onima koji su bili uz mene. Zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj podršci, potpori i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

# SADRŽAJ

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                                                                                    | <b>1</b>  |
| 1.1. Urolitijaza .....                                                                                                 | 1         |
| 1.1.1. Nastanak i vrste bubrežnih kamenaca .....                                                                       | 1         |
| 1.1.2. Klinička slika i dijagnoza.....                                                                                 | 3         |
| 1.1.3. Farmakoterapija urolitijaze.....                                                                                | 3         |
| 1.2. Kofein.....                                                                                                       | 4         |
| <b>2. HIPOTEZA.....</b>                                                                                                | <b>6</b>  |
| <b>3. CILJ.....</b>                                                                                                    | <b>7</b>  |
| <b>4. MATERIJALI I METODE.....</b>                                                                                     | <b>8</b>  |
| 4.1. Ustroj studije.....                                                                                               | 8         |
| 4.2. Materijali.....                                                                                                   | 8         |
| 4.3. Metode .....                                                                                                      | 8         |
| 4.3.1. Protokol za stvaranje kristala kalcijevog oksalata .....                                                        | 9         |
| 4.3.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) .....                                                          | 10        |
| 4.4. Statističke metode .....                                                                                          | 11        |
| <b>5. REZULTATI.....</b>                                                                                               | <b>12</b> |
| 5.1. Ispitivanje djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata i stanične linije LLC-PK tip I ..... | 12        |
| 5.1.1. Učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije nakon jednog sata .....            | 13        |
| 5.1.2. Učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije nakon tri sata .....               | 14        |
| 5.1.3. Učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije nakon 24 sata.....                 | 18        |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2. Ispitivanje djelovanja kofeina na stanice linije LLC-PK tip I..... | 22        |
| 5.3. Mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona.....                     | 23        |
| <b>6. RASPRAVA.....</b>                                                 | <b>26</b> |
| <b>7. ZAKLJUČAK.....</b>                                                | <b>29</b> |
| <b>8. SAŽETAK.....</b>                                                  | <b>30</b> |
| <b>9. SUMMARY .....</b>                                                 | <b>31</b> |
| <b>10. LITERATURA .....</b>                                             | <b>32</b> |
| <b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>                                              | <b>37</b> |

## POPIS KRATICA

|              |                                                                                                                                                   |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LLC-PK tip I | stanična linija proizvedena iz bubrega normalne, zdrave muške svinje ( <i>Sus scrofa</i> ) (engl. <i>Lilly Laboratories Cell Porcine Kidney</i> ) |
| NSPL         | Nesteroidni protuupalni lijekovi                                                                                                                  |
| RNK          | Ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribonucleic acid</i> , RNA)                                                                                     |
| DNK          | Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , DNA)                                                                          |
| IUPAC        | Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )                                |
| GSH          | Glutation (engl. <i>Glutathione</i> )                                                                                                             |
| DMEM         | Dulbeccov modificirani Eagle medij (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )                                                               |
| FBS          | Fetalni goveđi serum (engl. <i>Fetal bovine serum</i> )                                                                                           |
| PBS          | Fosfatom puferirana otopina soli (engl. <i>Phosphate buffered saline</i> )                                                                        |
| HCl          | Klorovodična kiselina (engl. <i>Hydrochloric acid</i> )                                                                                           |
| NaOH         | Natrijev hidroksid                                                                                                                                |
| CaOx         | Kalcijev oksalat (engl. <i>Calciumoxalate</i> )                                                                                                   |
| COM          | Kalcijev oksalat monohidrat (engl. <i>Calcium oxalate monohydrate</i> )                                                                           |
| NaCl         | Natrijev klorid                                                                                                                                   |
| Tris-HCl     | Tris hidroklorid (engl. <i>Tris hydrochloride</i> )                                                                                               |
| UV           | Ultraljubičasto (engl. <i>Ultra violet</i> )                                                                                                      |
| DTNB         | Ellmanov reagens - 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. <i>Dithionitrobenzoate</i> )                                                   |
| TNB          | 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. <i>5-thio-2-nitrobenzoic acid</i> )                                                                        |
| GSSG         | Oksidirani glutation (engl. <i>Glutathione disulfide</i> )                                                                                        |
| CT           | Kompjutorizirana tomografija (engl. <i>Computed tomography</i> )                                                                                  |
| ESWL         | Litotripsija ekstrakorporalnih udarnih valova (engl. <i>Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy</i> )                                               |
| IUPAC        | Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i> )                               |

|            |                                                                                                   |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aneksin A1 | Vezujući protein kristala kalcijevog monohidrata (engl. <i>COM crystal-binding proteins</i> )     |
| NADPH      | Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> ) |
| PBS        | Fosfatom puferirana otopina soli (engl. <i>Phosphate buffered salin</i> )                         |
| NHS        | Zdravstvena studija medicinskih sestara (engl. <i>Nurses Health Study</i> )                       |

## POPIS SLIKA

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1. Strukturna formula kofeina .....                                                                                                              | 4  |
| Slika 2. Strukturna formula glutationa .....                                                                                                           | 10 |
| Slika 3. Prikaz podataka o broju kristala kalcijevog oksalata po vremenu inkubacije u odnosu na različite koncentracije kofeina.....                   | 12 |
| Slika 4. Grafički prikaz ispitivanja djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata na staničnu liniju LLC-PK tip I nakon 1 h.....   | 14 |
| Slika 5. Grafički prikaz ispitivanja djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata na staničnu liniju LLC-PK tip I nakon 3 h.....   | 15 |
| Slika 6. Reprezentativna mikrofotografija kontrole nakon 3 h.....                                                                                      | 15 |
| Slika 7. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata nakon 3 h.....                                             | 16 |
| Slika 8. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kofeinom nakon 3 h .....                                                                  | 16 |
| Slika 9. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 3 sata.....                        | 17 |
| Slika 10. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 3 sata.....                         | 17 |
| Slika 11. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 3 sata.....                        | 18 |
| Slika 12. Grafički prikaz ispitivanja djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata na staničnu liniju LLC-PK tip I nakon 24 h..... | 19 |
| Slika 13. Reprezentativna mikrofotografija kontrole nakon 24 h .....                                                                                   | 19 |
| Slika 14. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata nakon 24 h.....                                           | 20 |
| Slika 15. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kofeinom nakon 24 h.....                                                                 | 20 |
| Slika 16. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 24 sata.....                      | 21 |

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 17. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 24 sata.....  | 21 |
| Slika 18. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 24 sata..... | 22 |
| Slika 19. Prikaz odnosa postotka ekspresije tGSH-a nakon dodanog kalcijevog oksalata i rastuće koncentracije kofeina .....       | 24 |

## POPIS TABLICA

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablica 1. Prikaz podataka prosječne vrijednosti tri mjerenja o broju kristala kalcijevog oksalata po vremenu inkubacije u odnosu na različite koncentracije kofeina..... | 13 |
| Tablica 2. Prikaz podataka o koncentraciji vijabilnih stanica LLC-PK tip I u odnosu na koncentraciju kofeina i prisutnost kalcijevog oksalata .....                       | 23 |
| Tablica 3. Prikaz odnosa aritmetičke sredine, standardne devijacije i postotka ekspresije tGSH-a na tretiranost stanica kalcijevim oksalatom i kofeinom .....             | 25 |

# 1. UVOD

### 1.1. Urolitijaza

Urolitijaza je prisutnost bubrežnih kamenaca u mokraćnom sustavu koja se očituje stvaranjem solidnih depozita unutar renalnog sustava. Predstavlja multifaktorsku bolest jer na nastajanje kamenaca utječu spol, genetska predispozicija, prehrana, tvrdoća vode (1). Bubrežni kamenci česta su pojava današnjeg društva, tijekom života javljaju se kod 5 – 10 % populacije te su izraženiji u mediteranskom području zbog povećanog unosa soli (2). Tipovi urolitijaze s obzirom na lokaciju formiranja dijele se na nefrolitijazu u kojoj je prisutnost bubrežnih kamenaca u području sabirnog sustava samog bubrega, ureterolitijazu, prisutnost kamenaca u području uretera te cistolitijazu u kojoj su se kamenci formirali u mokraćnom mjehuru (3). Bubrežni kamenci treća su najčešća bolest mokraćnog sustava, nakon uroinfekcije i bolesti prostate (4).

#### 1.1.1. Nastanak i vrste bubrežnih kamenaca

Kamenci se u osnovi sastoje od proteinskog matriksa te kristalizirajućeg materijala koji može biti sastavljen od kalcijevih soli, struvitnih, uratnih i cistinskih kamenaca te od različitog drugog materijala. Uzroci nastajanja kamenaca urotrakta jesu dijetalni čimbenici, čimbenici okoliša (izloženost suncu), hiperkalciurija (metabolički poremećaj u kojemu se prekomjerno izlučuje kalcij u mokraću), hiperurikozurija koja se definira kao dnevno izlučivanje urata > 800 mg u muškaraca i > 750 mg u žena, hiperoksalurija (povišeno stanje izlučivanja oksalata mokraćom), cistinurija (povećano izlučivanje cistina mokraćom koje dovodi do kristalizacije cistina i formiranja u konačnici cistinskih kamenaca), hipocitraturija u kojoj je izlučivanje citrata iz organizma manje od 1,7 mmol na dan te rekurentne urinarne infekcije (5). Na stvaranje kristala u urinu utječu čimbenici poput staza urina te prisutnost nukleusa za stvaranje kamenaca, pH urina (alkalni urin pogoduje stvaranju struvitnih kamenaca, a kiseli uratnih), smanjeni unos tekućine i visoka koncentracija kalcija u urinu uz porast pH te smanjenje koncentracije citrata u urinu (6). Oko 80 % mokraćnih kamenaca sastoji se od kalcija (Ca) u kombinaciji s oksalatom ili fosfatom. Kod oksalatne urolitijaze izlaganje bubrežnih endotelih stanica oksalatu rezultira povećanim nastankom slobodnih radikala koji pridonose oštećenju istih, te u konačnici superponiraju oštećenje bubrežne funkcije (6, 7).

## 1. UVOD

Bubrežni kamenci dijele se na kalcijske i nekalcijske. Kalcijски kamenci praćeni su hiperkalciurijom. S obzirom na mehanizam nastanka dijele se na:

- a) Apsorptivni hiperkalciurijski, najćešći tip kalcijских kamenaca. Kalcij-oksalatni ili kalcij-fosfatni kamenci stvaraju se zbog visokih koncentracija kalcija u urinu. Tip I apsorptivnih hiperkalciurijskih kamenaca predstavlja 15 % svih kalcijevih kamenaca. Tip II, za razliku od tipa I, ovisi o prehrani. Bolesnici dijetalnom prehranom moraju smanjiti dnevni unos kalcija. U tipu III do hiperkalciurije dolazi zbog gubitka fosfata bubregom (8).
- b) Resorptivni hiperkalciurijski kamenci nastaju kao posljedica hiperparatireoidizma. U skupinu bolesnika s takvim kamencima pripadaju bolesnici s kalcij-fosfatnim kamencima i s ponavljajućim kalcijevim kamencima.
- c) Bubregom inducirani hiperkalciurijski kamenci posljedica su tubularnog defekta u ekskreciji kalcija u bubregu.
- d) Hiperurikozurićki kalcijски kamenci posljedica su porasta mokraćne kiseline u urinu ili povišenog unosa purina.
- e) Hiperoksalurićki kalcijски kamenci posljedica su porasta oksalata, najćešće u bolesnika u kojima je prisutna teška dehidracija.
- f) Hipocitraturični kalcijски kamenci nalaze se u bolesnika s renalnom tubularnom acidozom tipa I.

Nekalcijски kamenci dijele se na:

- a) Struvitne ili magnezij-amonij fosfatne kamence koji nastaju kao posljedica infekcije bakterijama koje posjeduju enzim ureazu (Proteus, Pseudomonas, Providencia, Ureaplasma, Mycoplasma) kojom razgrađuju ureu i time alkaliziraju urin.
- b) Urićne kamence kod bolesnika s gihtom te mijeloproliferativnim bolestima. Povišena razina mokraćne kiseline posljedica je dehidracije i visokog unosa purina.

## 1. UVOD

- c) Cistinske kamence koji nastaju kao posljedica urođene metaboličke greške u apsorpciji aminokiselina cistina, ornitina, arginina i lizina.
- d) Ksantinske kamence koji nastaju kao posljedica kongenitalnog deficita ksantin-oksidade.
- e) Indinavirske kamence koji nastaju kao posljedica primjene indinavira.
- f) Rijetke oblike kamenaca poput silikatnih i triamterenskih kamenaca (9 - 12).

### 1.1.2. Klinička slika i dijagnoza

Bolesnici s urolitijazom imaju kliničku sliku akutnih ureteralnih kolika čiji bolovi započinju lumbalno, a praćeni su mučninom i povraćanjem, upalom urotrakta i vrućicom. U procjeni potrebno je načiniti laboratorijske preglede poput analize urina koja može pokazati hematuriju, kristaluriju i leukocituriju, potom sedimentaciju eritrocita, kompletnu krvnu sliku, kreatinin, urate, kalcij, fosfor (13, 14). Dijagnoza se postavlja i slikovnim metodama poput ultrazvučnog pregleda bubrega, zbog čije se nedovoljne osjetljivosti radi i nativni radiogram ili intravenska urografija, zatim retrogradna ureteropijelografija ili anterogradna pijeloureterografija. Kompjutorizirana tomografija (CT) zlatni je standard u dijagnosticiranju kamenaca s obzirom na to da prikazuje kamenac, njegovu veličinu, anatomsku lokaciju te pomaže u odabiru najprikladnijeg načina odstranjivanja (15 - 17).

### 1.1.3. Farmakoterapija urolitijaze

S obzirom na to da urolitijaza predstavlja izrazito bolna stanja koja se očituju u lokaliziranom lumbalnom dijelu s tendencijom širenja ka preponama i spolnim organima uslijed pokretanja kamenaca u bubregu, prvi izbor lijekova koji se koristi jesu nesteroidni protuupalni lijekovi. Druga su skupina lijekova koja se primjenjuje opiodi koji, za razliku od NSPL-a, ne ovise o bubrežnoj funkciji niti povećavaju rizik od krvarenja. Liječenje se provodi medikamentoznom terapijom, prvenstveno tiazidskim diureticima koji se koriste u snižavanju kalcija u urinu, alkalizirajućim tvarima poput kalij-citrata kako bi se povećala koncentracija citrata u urinu koji je inhibitor stvaranja kamenaca. Koriste se lijekovi poput alopurinola, inhibitora ksantin-oksidade koji smanjuje razinu urične kiseline u serumu i urinu te inhibitori apsorpcije iz probavnog trakta poput celuloza fosfata koji veže kalcij u crijevu te

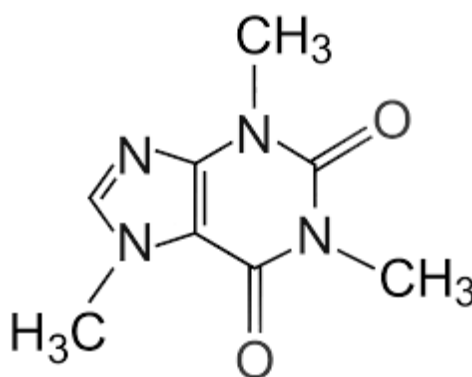
## 1. UVOD

smanjuje apsorpciju kalcija i njegovu ekskreciju putem crijeva. Ortofosfatnim lijekovima nadomješta se fosfat za koji se smatra da smanjuje ekskreciju kalcija uz pomoć inhibicije sinteze kalcitriola te samim time i hiperkalciuriju i pojačan nastanak kalcijevih kristala i kamenaca (18 - 21). Uspješna eliminacija kamenaca može se postići korištenjem udara elektrohidrauličkih valova, koji će ih fragmentirati te se zatim spontano eliminirati urinom. Pri većim kamencima indiciran je kirurški zahvat (22).

Urolitijaza je i dalje značajan klinički problem čija etiopatogeneza nije do kraja razjašnjena. Velika većina bolesnika spontano izmokri kamence, ipak simptomatska terapija ima prednost. Preventivnim mjerama poput velikog unosa tekućine, uz posljedičnu obilnu diurezu te dijetalne mjere može se utjecati na pojavu urolitijaze i smanjiti broj recidiva (23 - 25).

### 1.2. Kofein

Kofein je najzastupljeniji metilksantinski alkaloid, bijeli kristalni purin, kemijski povezan s gvaninskim i adeninskim bazama ribonukleinske kiseline (RNK) i deoksiribonukleinske kiseline (DNK), koji nastaje metilacijom teobromina (26).



*Slika 1. Strukturna formula kofeina*

Najpoznatiji izvori kofeina su kava, kakao, listovi čaja, bezalkoholna i energetska pića. Kemijska formula je C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, a naziv prema IUPAC-u je 1,3,5-trimetilpurin-2,6-dion. Sadrži imidazolni prsten spojen na pirimidinski prsten. Čisti kofein ima oblik bijelih, šesterokutnih kristala koji se mogu usitniti u mekani prah. Umjereno je topljiv u vodi na

## 1. UVOD

sobnoj temperaturi, ali je vrlo topljiv u kipućoj vodi. Nakon konzumacije, kofein se brzo i potpuno apsorbira u gastrointestinalnom traktu i dalje distribuira u različita tkiva, uključujući bubrege. Apsorbirani se kofein zatim metabolizira, dok 0,5 – 3 % ostaje nepromijenjeno i izlučuje se urinom (27).

Kohortne studije pokazale su da je konzumacija kofeinskih pića povezana s nižim rizikom od bolesti bubrežnih kamenaca, procijenjeni su zaštitni učinci kofeina na formaciji bubrežnog kamena kalcijevog oksalatnog monohidrata. Međutim, njegovi zaštitni mehanizmi ostali su nepoznati i nisu prethodno istraživani (28 - 29). Tako su procijenjeni zaštitni učinci kofeina (1  $\mu$ M – 10 mM) na formiranje bubrežnih kamenaca kalcijevog oksalata (COM), koristeći kristalizaciju, rast kristala, *Western blotting* i imunofluorescentne analize. Rezultati su pokazali da je kofein smanjio broj kristala, ali, s druge strane, povećao veličinu kristala, što je rezultiralo nepromijenjenom kristalnom masom, u skladu s rastom kristala koji nije bio pod utjecajem kofeina (30).

Podatci studija djelomično mogu objasniti povezanost konzumacije kofeina i njegovog preventivnog djelovanja koji su doveli do manjeg rizika nastanka bubrežnih kamenaca te mogu dovesti do razvoja zaštitnih strategija za sprječavanje urolitijaze i njezina ponavljanja (31).

## 2. HIPOTEZA

## **2. HIPOTEZA**

Primjena kofeina sprječava nastanak kristalizacije kalcijevog oksalatnog monohidrata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK tip I.

### 3. CILJ

### 3. CILJ

Ciljevi su ovoga istraživanja utvrditi toksični učinak kalcijevog oksalatnog monohidrata u različitom razdoblju izloženosti u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK tip I, procijeniti učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije kalcijevog oksalata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK tip I te odrediti razinu opterećenja stanica slobodnim radikalima mjerenjem koncentracija glutaciona (GSH) nakon tretmana kalcijevim oksalatom i kofeinom.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je napravljena u obliku randomiziranog kontroliranog pokusa.

### 4.2. Materijali

Koristile su se LLC-PK tip I (engl. *Lilly Laboratories Cell Porcine Kidney*), stanična linija koja je proizvedena iz bubrega normalne, zdrave muške svinje (*Sus scrofa*) između 3. i 4. tjedna starosti. Svinja je bila pripadnica pasmine Hampshire. Uobičajeno se upotrebljava u laboratorijima širom svijeta, pokazuje tipičnu epitelnu morfologiju te se koristi kao model za epitelno tkivo, kao i u širokom spektru farmakoloških i metaboličkih znanstvenih istraživanja (32). Stanična linija velikodušan je dar profesora Carla Verkoelena s Klinike za urologiju, Erasmus Medicinskog centra, Rotterdam, Nizozemska. Od kemikalija se koristio kalcijev oksalat, natrijev oksalat te kofein (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). Stanice su se tijekom pokusa ispirale po potrebi puferiranom fiziološkom otopinom (PBS) te su se tretirale tripsinom. Boja *Trypan blue* korištena je za određivanje vijabilnosti stanica (33 - 34).

### 4.3. Metode

Uzgoj je započeo odmrzavanjem stanica koje su se čuvale zamrznute na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u tekućem dušiku. Stanice su bile uzgajane u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (DMEM) (GIBCO, SAD) uz dodatak 10 %-tnog fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal bovine serum*, FBS) (GIBCO, SAD) te 1 %-tne otopine antibiotika/antimikotika (penicilin i streptomycin) (Thermo Fisher Scientific INC, Waltham, MA). Sav rad sa stanicama odvijao se u digestoru klase II za rad sa staničnim kulturama s jednosmjernim horizontalnim protokom zraka prema van, uz korištenje rukavica te pomne sterilizacije površina i korištenog unesenog pribora. Stanice su se uzgajale u pločama sa šest jažica te su se tretirale kalcijevim oksalatom i kofeinom u odgovarajućim koncentracijama. Nakon inkubacije u inkubatoru na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , svjetlosnom mikroskopijom brojali su se nastali kristali nakon jednog sata, tri sata te 24 sata i učinile su se mikrofotografije. Randomizacija je bila učinjena blok dizajnom te su svi eksperimenti bili ponovljeni tri puta.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.3.1. Protokol za stvaranje kristala kalcijevog oksalata

Od 10 mM Tris-HCL i 90 mM NaCl pri pH 6,5 napravljen je pufer u odmjernoj tikvici i stavljena je magnetska pločica za miješanje. Pripremljene su dvije otopine, otopina NaOH i HCl koje su stavljene u menzuru koja se zatim nadopunila destiliranom vodom. NaOH zbog svoje lužnatosti koristi se kao pH regulator, a HCl zbog svoje kiselosti također služi pri kontroli pH otopina. Nakon što je priređena otopina i prethodno izvršena kalibracija elektrode, ona se postavlja u otopinu u kojoj se želi izmjeriti pH. Dodaje se kiselina (HCl) ili baza (NaOH) po potrebi da se postigne željeni pH 6,5. Namještanje i očitavanje pH vrijednosti izvršilo se staklenom elektrodom na pH metru HANNA. Mehaničko miješanje omogućeno je magnetskom pločicom za miješanje. Kada se završilo mjerenje, izvadila se elektroda iz otopine te se uklonila voda. Priređena otopina održavala se na 37 °C.

5 mM CaOx dodan je u bazični pufer TrisHCl. Bijela mutna otopina miješana je na 150 rpm tijekom 24 sata i ostavljena bez drmanja da bi se kristali usporili. Nakon 24 sata otopina je centrifugirana na 3000 rpm 5 minuta. Supernatant se odbacio i kristali su sakupljeni. Kristali su dvaput isprani metanolom potom centrifugirani na 3000 rpm 5 minuta. Uklonjen je metanol te je odrađena dekontaminacija UV zračenjem na 30 minuta.

Za ispitivanje utjecaja kofeina i toksičnosti kalcijevog oksalata, subkultivirane stanice iz Petrijeve zdjelice ponovno su prebačene u ploču sa šest jažica s medijem te nakon uzgajanja stanica do pune konfluentnosti, ispran je medij, a u svaku jažicu dodan je sljedeći sadržaj: u kontrolnu jažicu stavljen je medij sa stanicama gustoće  $4 \times 10^5$  stanica/mililitru, u drugu jažicu stavljeno je osim medija i 8 mM kristala kalcijevog oksalata. U treću jažicu ponovno je stavljen medij i kofein koncentracije 1 mM, a u četvrtu jažicu medij, kristali kalcijevog oksalata te kofein u najmanjoj koncentraciji od 0,1 mM. U petu su jažicu stavljeni medij, kristali kalcijevog oksalata i kofein u koncentraciji od 1 mM. Naposljetku, u šestu jažicu stavljeni su medij, kristali kalcijevog oksalata i kofein u najvećoj koncentraciji od 10 mM. Stanice su zatim ostavljene u inkubatoru na 37 °C pri 5 % CO<sub>2</sub> te je svjetlosnom mikroskopijom praćen broj kristala kalcijevog oksalata nakon 1 sata, 3 sata te 24 sata.

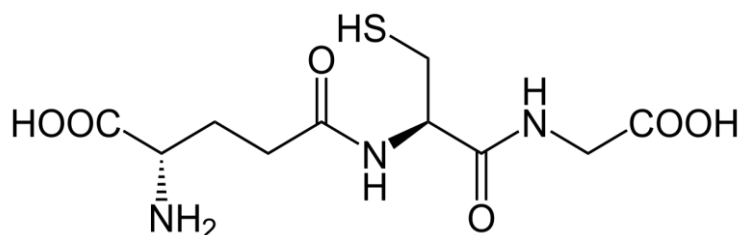
Mikrofotografije učinjene su EVOS<sup>TM</sup> FL Color, potpunim integriranim, digitalnim, invertnim mikroskopom koji kombinira preciznu optiku, LCD zaslon visoke razlučivosti od 15 inča i visoku osjetljivu Sony ICX285AQ CCC kameru (rezolucija od 1360 x 1024 piksela).

#### 4. MATERIJALI I METODE

Po protokolu za tripsinizaciju, drugi je dan sadržaj svake jažice tripsiniziran i prebačen s medijem u tubice, potom je određeni volumen prebačen u ependorfice i dodano je tripan plavilo radi bojanja vijabilnih stanica pod svjetlosnim mikroskopom (srednje povećanje) u Neubauerovom hemocitometru.

##### 4.3.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona (tGSH)

Vezujući na sebe štetne spojeve, glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamil-cistenil-glicin), tiolni tripeptid kao jedan od najpoznatijih te ujedno i najvažnijih neenzimskih antioksidansa, smanjuje njihovu biološku aktivnost. Ulogu ima u nizu fizioloških procesa kao što su transport aminokiselina, proliferacija stanica, aktivacija enzima. Glutacion je prisutan u dvama oblicima: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Iz njihovog omjera moguće je dobiti podatke o oksidacijskom stanju stanice.



Slika 2. Strukturna formula glutationa

Stanice LLC-PK tip I u pločici sa šest jažica nasadene su u koncentraciji  $4 \times 10^5$  stanica po jednom mililitru medija. U kontrolnoj (trećoj) jažici dodana je srednja vrijednost kofeina, u četvrtoj je dodan kofein u 0,1 mM koncentraciji, u petoj 1 mM te 10 mM u šestoj. U drugoj, četvrtoj, petoj i šestoj jažici dodano je 8 mM kalcijevog oksalata. Nakon inkubacije preko noći, drugi dan promijenio se medij u DMEM-u bez FBS-a. Trećeg dana uklonjen je medij iz svih jažica, isprane su PBS-om te su uz pomoć gumene *cell scraper* za stanične kulture odljepljene od površine.

#### 4. MATERIJALI I METODE

Ekskluzijskim testom *Trypan blue* (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) bojom utvrdila se vijabilnost stanica u suspenziji uz pomoću Neubauerovog hemocitometra pod svjetlosnim mikroskopom pod srednjim povećanjem. Svi rezultati izrazili su se kao postotci u odnosu na kontrolnu skupinu koja je bila uzgajana isključivo u DMEM-u.

Pomoću komercijalno dostupnog kita (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD) izmjerena je spektrofotometrijski koncentracija ukupnog glutationa (tGSH) prema protokolu proizvođača. Za dobivanje taloga stanica na dnu tubice, uzorak je najprije centrifugiran na 600 xg, supernatant je uklonjen te je dodana 5 % 5-sulfosalicilna kiselina i potom su stanice vorteksirane. Stanice su dvaput bile zamrznute i odmrznute i centrifugirane na 10 000 xg 10 minuta. Uklonjeni supernatant korišten je za mjerenje koncentracije GSH-a.

Princip metode zasniva se na kinetičkoj metodi, odnosno mjerenju kontinuirane redukcije 5, 5'-ditiobis (2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) katalitičkim količinama GSH-a, pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) i GSSG (glutation disulfida). Mjerenje je odrađeno prema Sigma Aldrich protokolu (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD). Porast apsorbancije mjerio se pri valnoj duljini od 412 nm pomoću čitača miktotitarskih pločica (iMark™ Microplate Absorbance Reader), a događa se zbog nastajanja TNB-a. Nastali TNB i GSSG recikliraju se u enzimskoj reakciji kataliziranoj glutation-reduktazom (GR) uz NADPH kao donora elektrona (35).

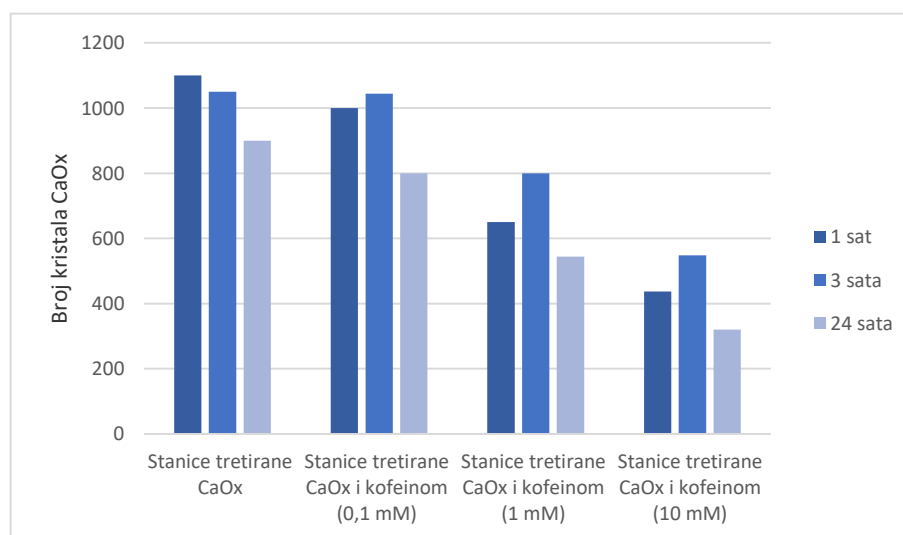
#### 4.4. Statističke metode

Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u slučaju raspodjele koje ne slijede normalnu razdiobu, medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike između dviju nezavisnih skupina normalno raspodijeljenih numeričkih podataka testirane su Studentovim T-testom, u slučaju kada varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu koristio se neparametrijski analog (Man-Whitney U test). Statistička analiza učinjena je programom Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) uz odabranu razinu značajnosti od  $p = 0.05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Ispitivanje djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata i stanične linije LLC-PK tip I

Nakon jednog sata i 24 sata inkubacije stanica ispitivanih u sklopu određivanja utjecaja kofeina na kristale kalcijevog oksalata u staničnom modelu urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK tip I, gdje su stanice bile izložene jednakim količinama kalcijevog oksalata i određenim koncentracijama kofeina, izbrojan je broj kristala kalcijevog oksalatnog monohidrata u jažicama te je bio u padajućim vrijednostima u odnosu na rastuću koncentraciju kofeina. Međutim, nakon trosatne inkubacije, broj nastalih kristala u četvrtoj, petoj i šestoj jažici koje su redom sadržavale koncentracije kofeina od 0,1 mM, 1 mM i 10 mM, s obzirom na prethodno izbrojen broj kristala kalcijevog oksalata nakon jednog sata inkubacije, nije se smanjivao. S obzirom na koncentraciju kofeina rezultati broja kristala i nakon tri sata inkubacije pokazali su da je kristalizacija i nakon jednog i 24 sata bila manja što je koncentracija kofeina bila veća. Rezultati su prikazani na slici 3. i tablici 1. Prva jažica korištena je kao slijepa proba u kojoj se nalazio samo medij te nije moglo doći do kristalizacije stoga je prikaz rezultata te jažice izostavljen. Kofein i medij stavljeni su u treću jažicu bez kalcijevog oksalata te je i ona izostavljena u prikazu rezultata, budući da ni u njoj nije došlo do kristalizacije.



Slika 3. Prikaz podataka o broju kristala kalcijevog oksalata po vremenu inkubacije u odnosu na različite koncentracije kofeina

## 5. REZULTATI

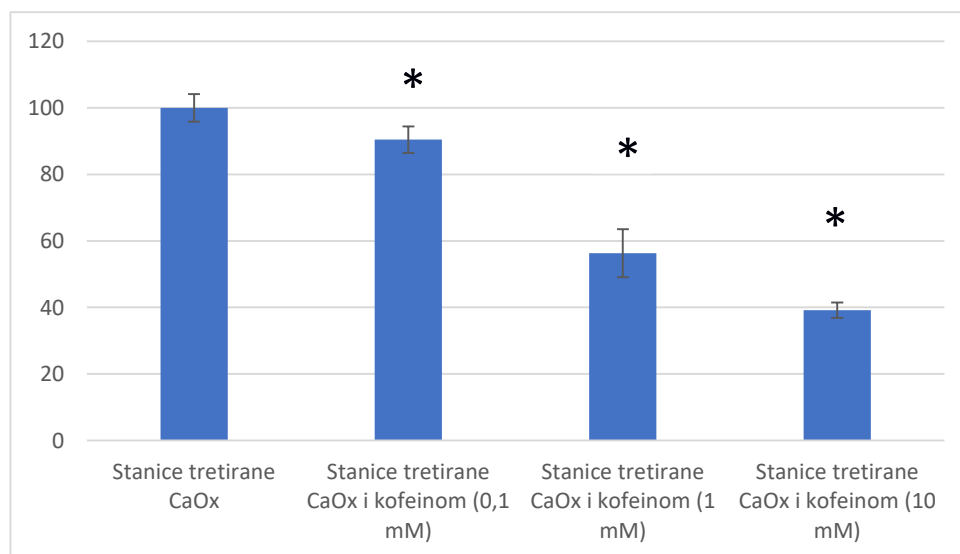
*Tablica 1. Prikaz podataka prosječne vrijednosti tri mjerenja o broju kristala kalcijevog oksalata po vremenu inkubacije u odnosu na različite koncentracije kofeina*

| Vrijeme inkubacije                         | Broj kristala CaOx |         |        |
|--------------------------------------------|--------------------|---------|--------|
|                                            | 1 h                | 3 h     | 24 h   |
| Stanice tretirane CaOx                     | 1083,33            | 1041,66 | 910    |
| Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM) | 980                | 1023    | 810,66 |
| Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)   | 610                | 716,66  | 544,66 |
| Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)  | 992                | 524,33  | 330    |

### **5.1.1. Učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije nakon jednog sata**

Nakon jednosatne inkubacije stanica u određivanju učinkovitosti kofeina na kristalizaciju kalcijevog oksalata u četvrtoj, petoj i šestoj jažici koje su bile izložene jednakim količinama kalcijevog oksalata i rastućim koncentracijama kofeina, nakon brojanja kristala u spomenutim jažicama izbrojano je smanjenje broja kristala. Ta učinkovitost kofeina u zaustavljanju kristalizacije prikazana je na slici 4.

## 5. REZULTATI

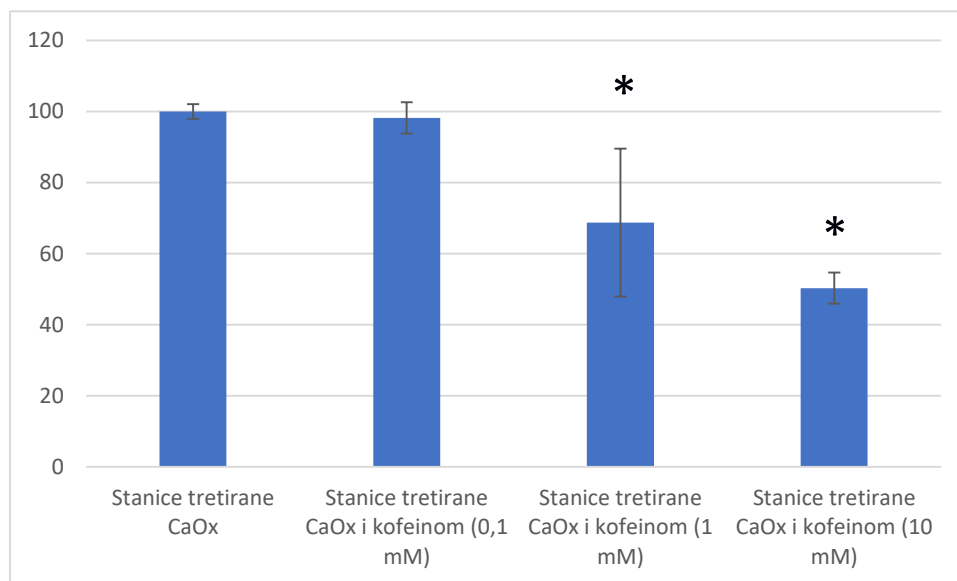


*Slika 4. Grafički prikaz ispitivanja djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata na staničnu liniju LLC-PK tip I nakon 1h. Stanice su tretirane kofeinom 1 h pri koncentracijama od 0,1 mM, 1 mM i 10 mM. Rezultati su prikazani kao postotak stvorenih kristala u odnosu na kontrolu. Stupci označeni zvjezdicom (\*) znače statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), određenu pomoću Studentova T-testa kada se usporede sa kontrolnim stanicama tretiranim samo s kalcijevim oksalatom.*

### **5.1.2. Učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije nakon tri sata**

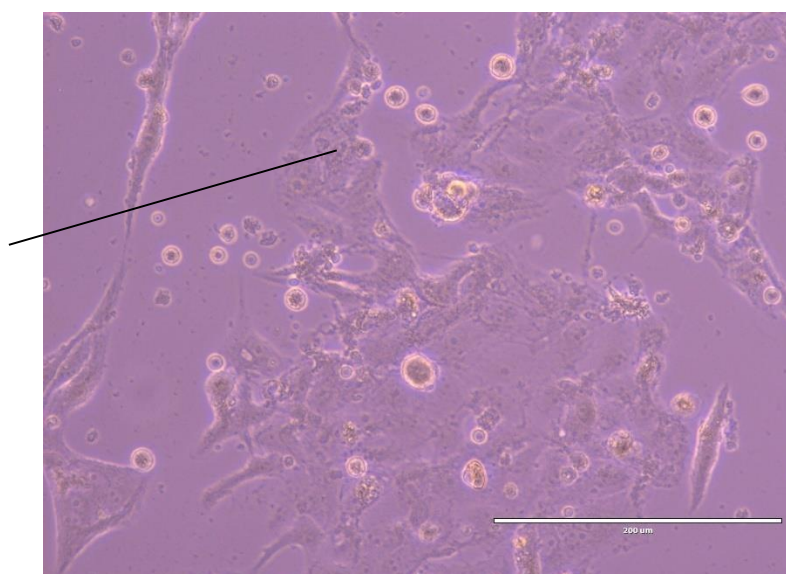
Nakon trosatne inkubacije uočena je pak daljnja kristalizacija, ali je kao i nakon inkubacije nakon jednog sata uočeno da je najveća koncentracija od 10 mM imala najveći protektivni učinak u oksidativnom oštećenju i kristalizaciji na stanice linije LLC-PK tip I (slika 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11.).

## 5. REZULTATI



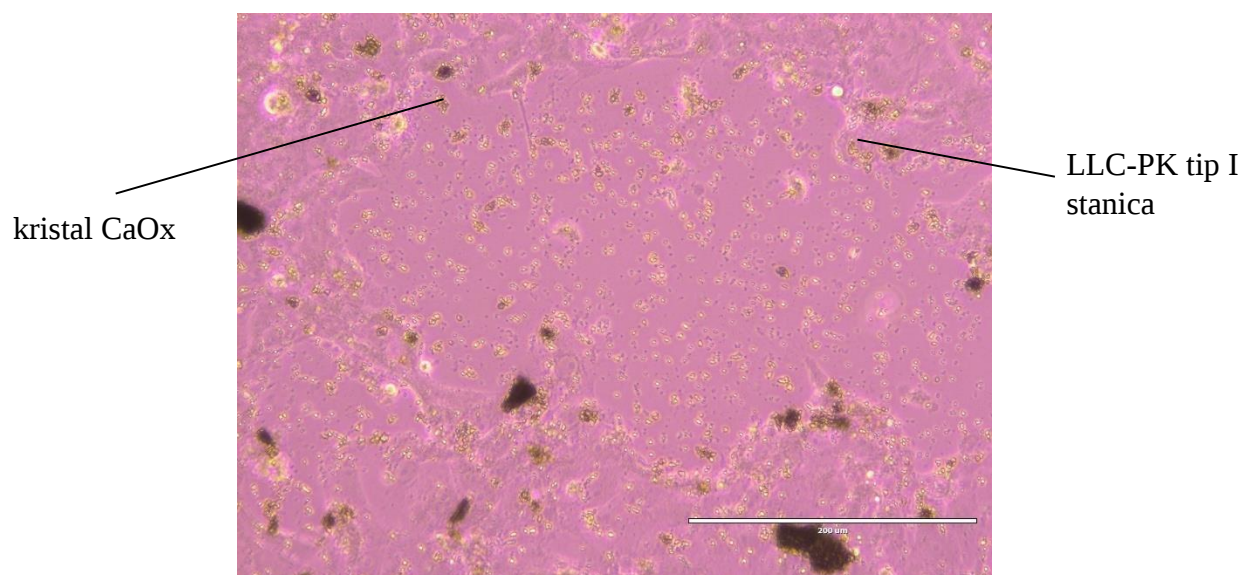
Slika 5. Grafički prikaz ispitivanja djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata na staničnu liniju LLC-PK tip I nakon 3 h. Stanice su tretirane kofeinom 3 h pri koncentracijama od 0,1 mM, 1 mM i 10 mM. Rezultati su prikazani kao postotak stvorenih kristala u odnosu na kontrolu. Stupci označeni zvjezdicom (\*) znače statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), određenu pomoću Studentova T-testa kada se usporede sa kontrolnim stanicama tretiranim samo s kalcijevim oksalatom.

LLC-PK tip I  
stanica

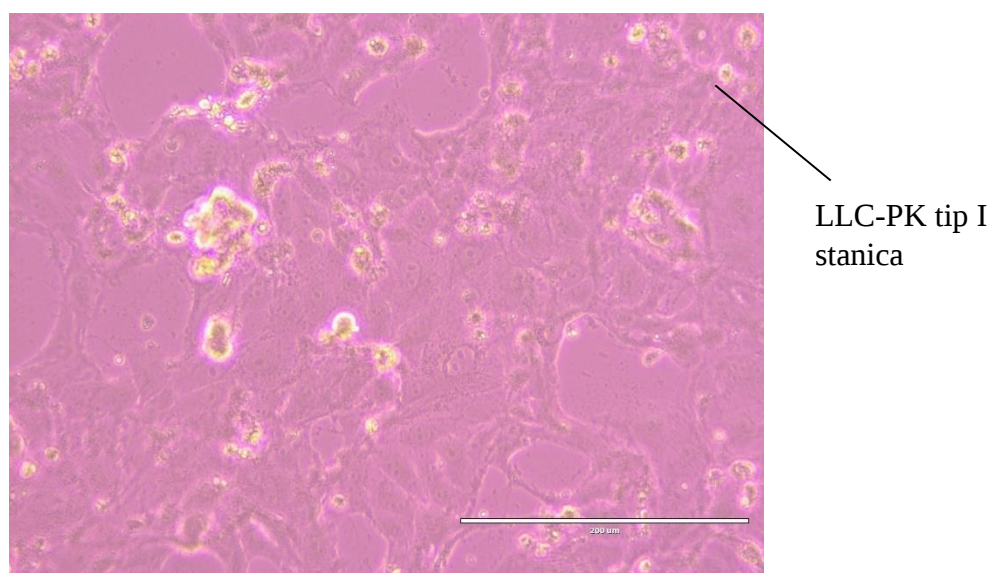


Slika 6. Reprezentativna mikrofotografija kontrole nakon 3 h

## 5. REZULTATI

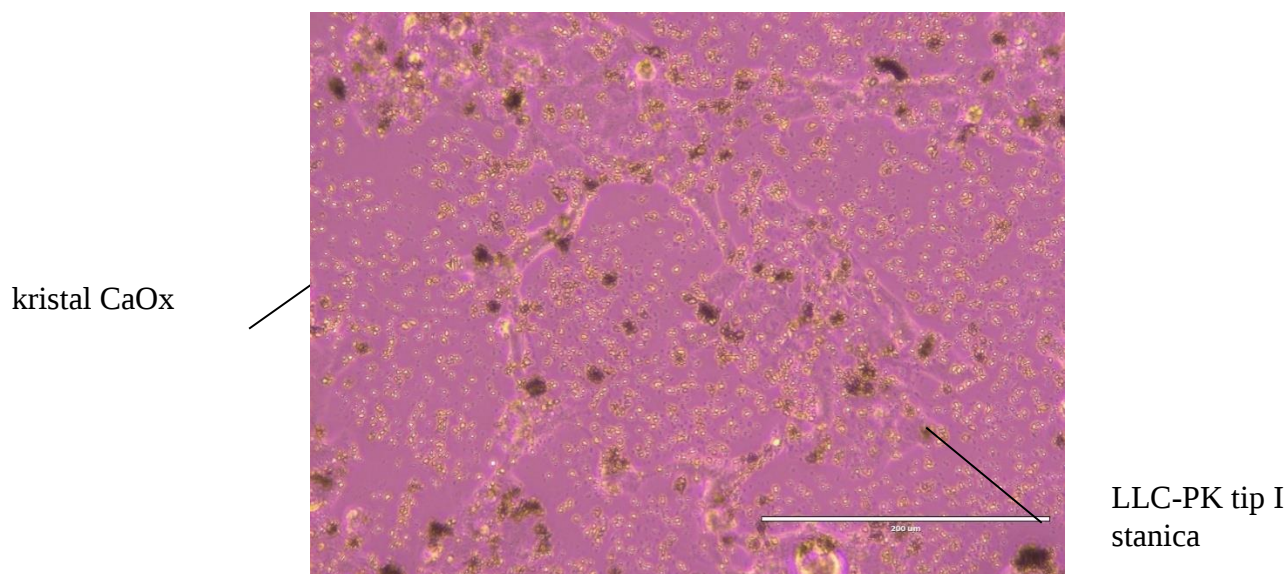


*Slika 7. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata nakon 3 h*

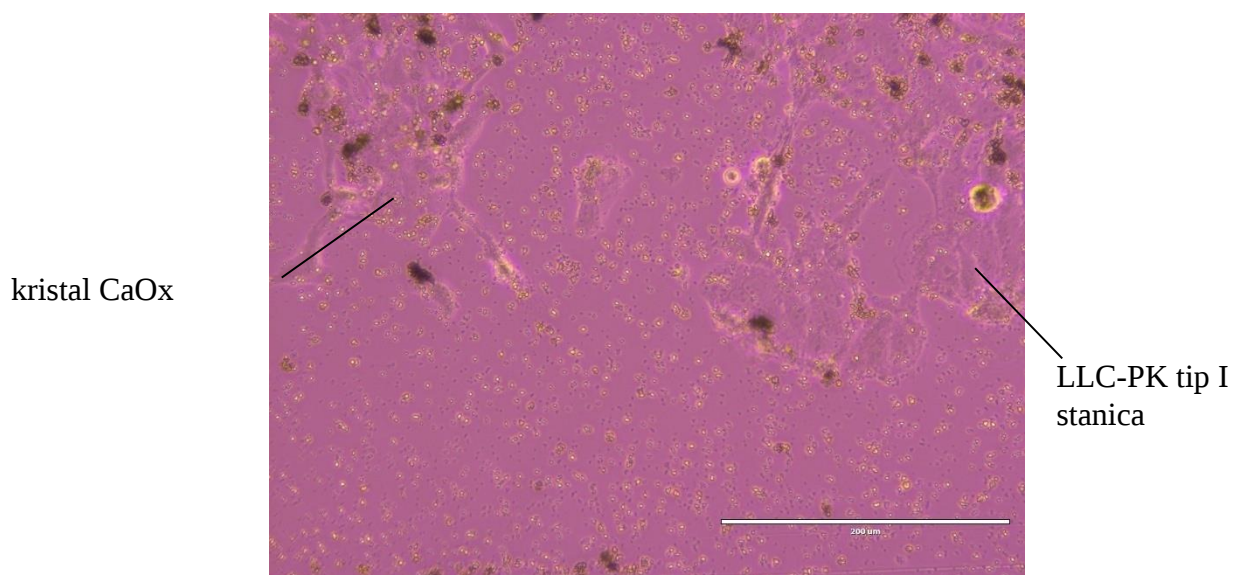


*Slika 8. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kofeinom nakon 3 h*

## 5. REZULTATI

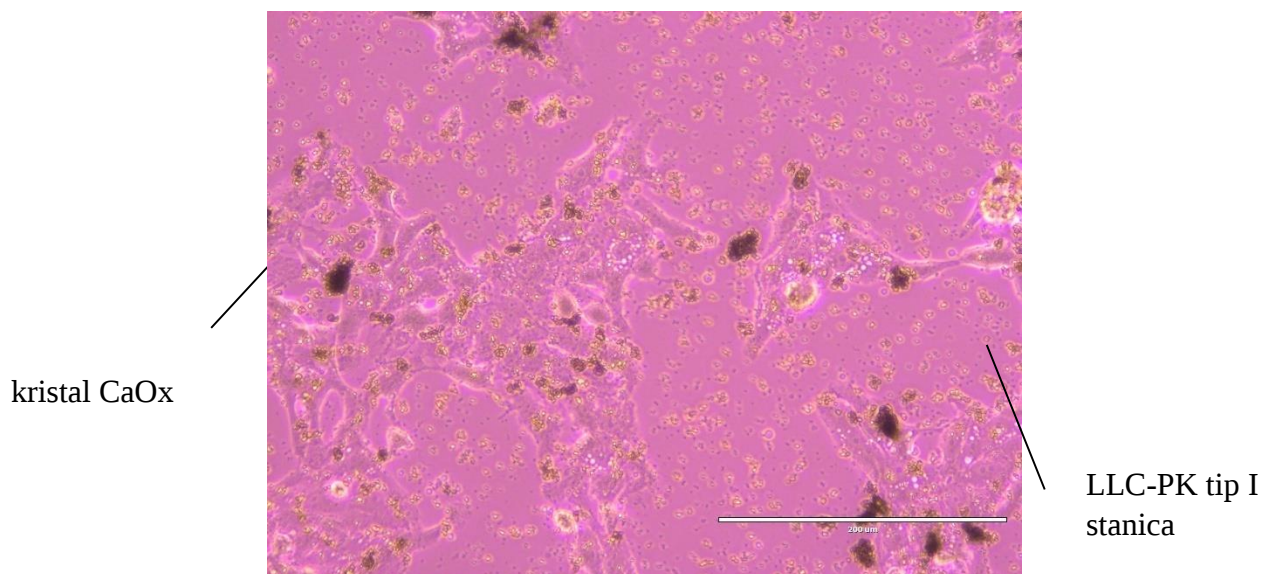


*Slika 9. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 3 sata*



*Slika 10. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 3 sata*

## 5. REZULTATI

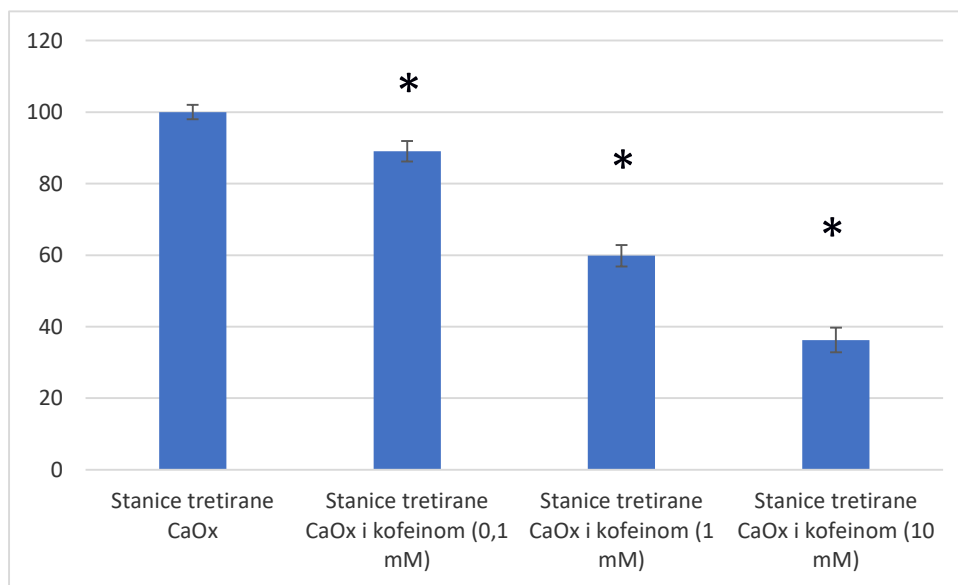


*Slika 11. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 3 sata*

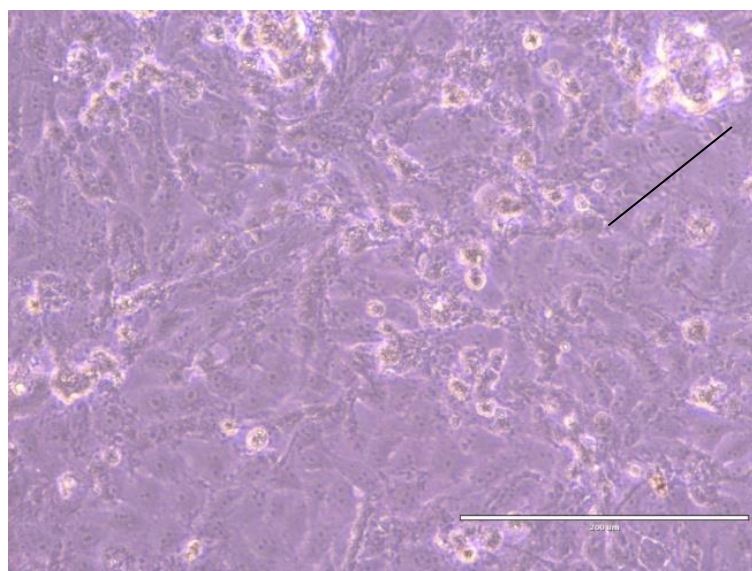
### **5.1.3. Učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije nakon 24 sata**

Nakon kraja 24-satne inkubacije broj kristala kalcijevog oksalata monohidrata krenuo je opadati kako je i krenuo nakon prvog sata inkubacije. Veće koncentracije kofeina proporcionalne su sa smanjenjem broja kristala (slika 12., 13., 14., 15., 16., 17. i 18.).

## 5. REZULTATI



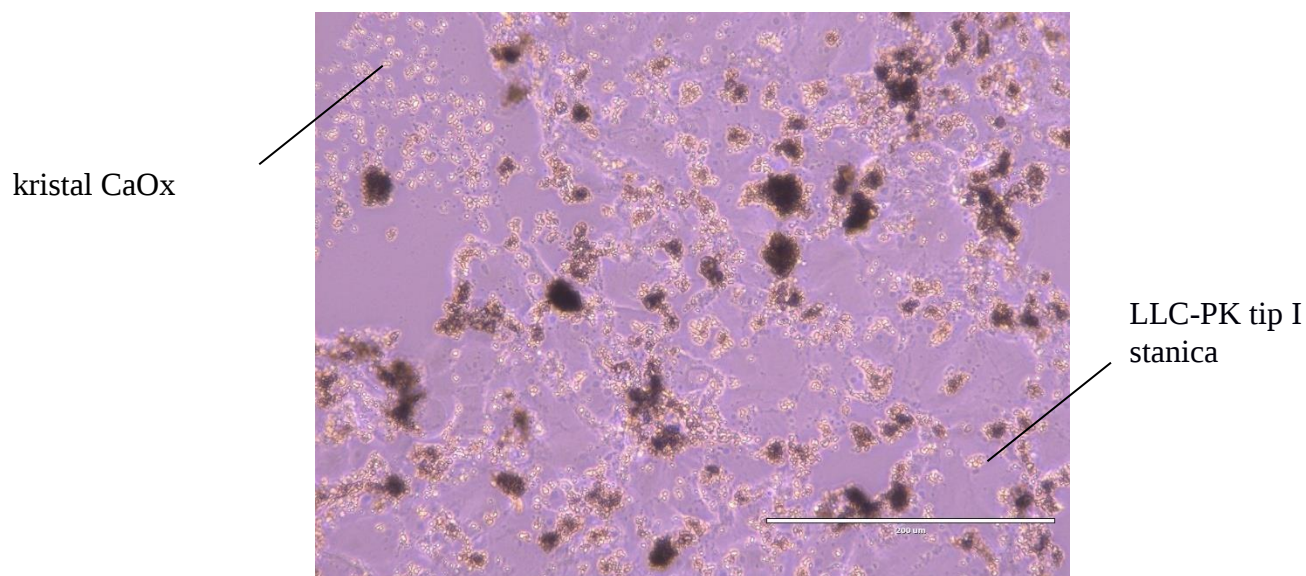
*Slika 12. Grafički prikaz ispitivanja djelovanja kofeina na kristale kalcijevog oksalatnog monohidrata na staničnu liniju LLC-PK tip I nakon 24 h. Stanice su tretirane kofeinom 24 h pri koncentracijama od 0,1 mM, 1 mM i 10 mM. Rezultati su prikazani kao postotak stvorenih kristala u odnosu na kontrolu. Stupci označeni zvjezdicom (\*) znače statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), određenu pomoću Studentova T-testa kada se usporede sa kontrolnim stanicama tretiranim samo s kalcijevim oksalatom.*



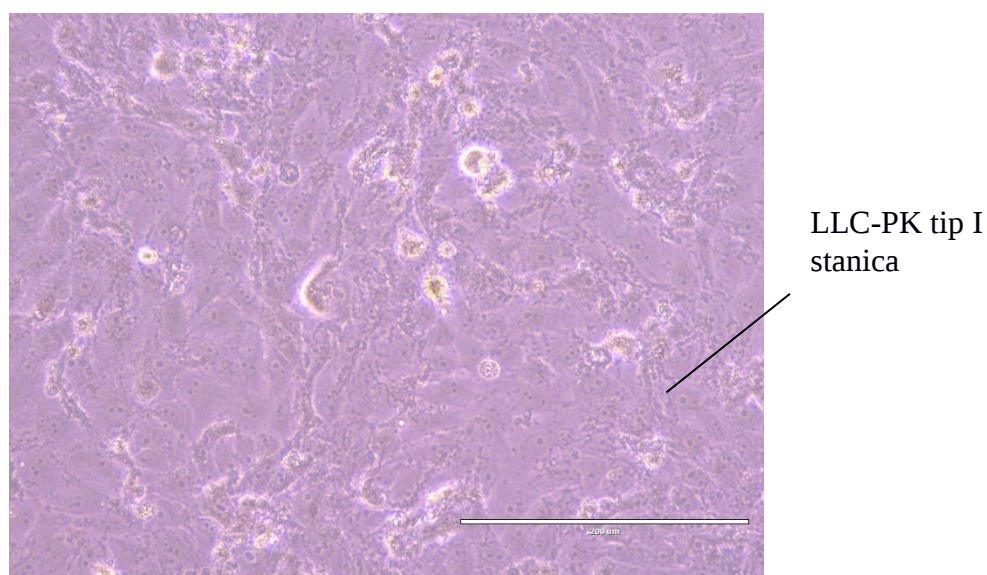
LLC-PK tip I stanica

*Slika 13. Reprezentativna mikrofotografija kontrole nakon 24 h*

## 5. REZULTATI

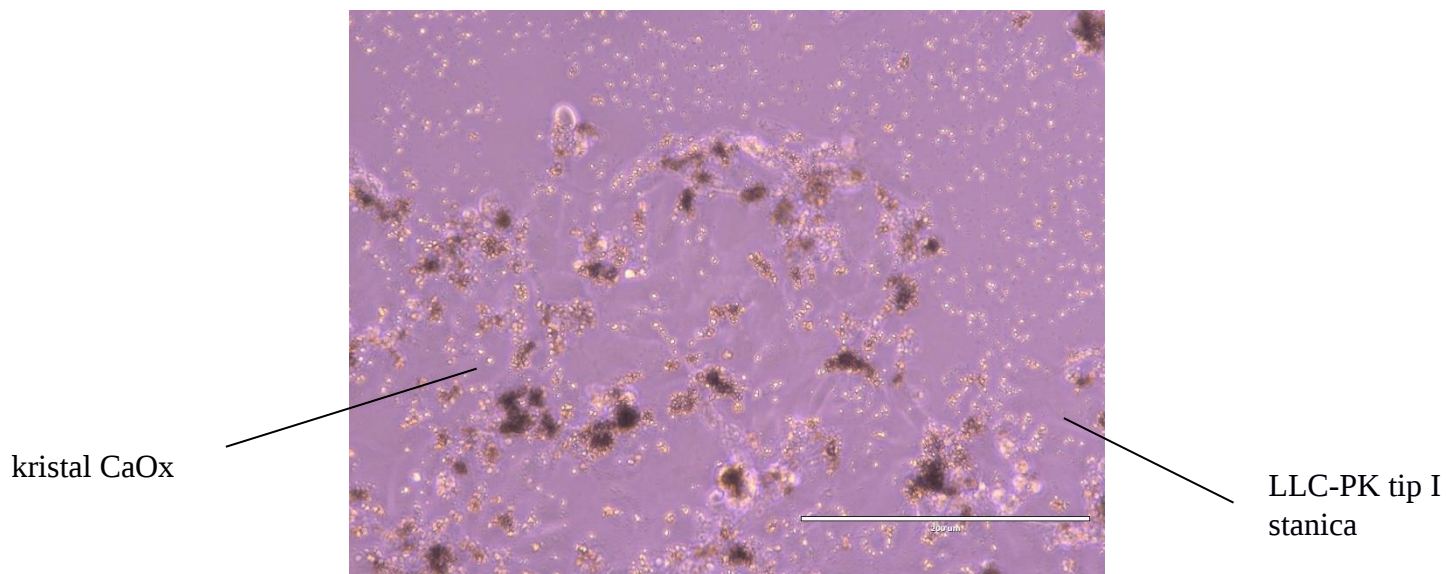


*Slika 14. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata nakon 24 h*

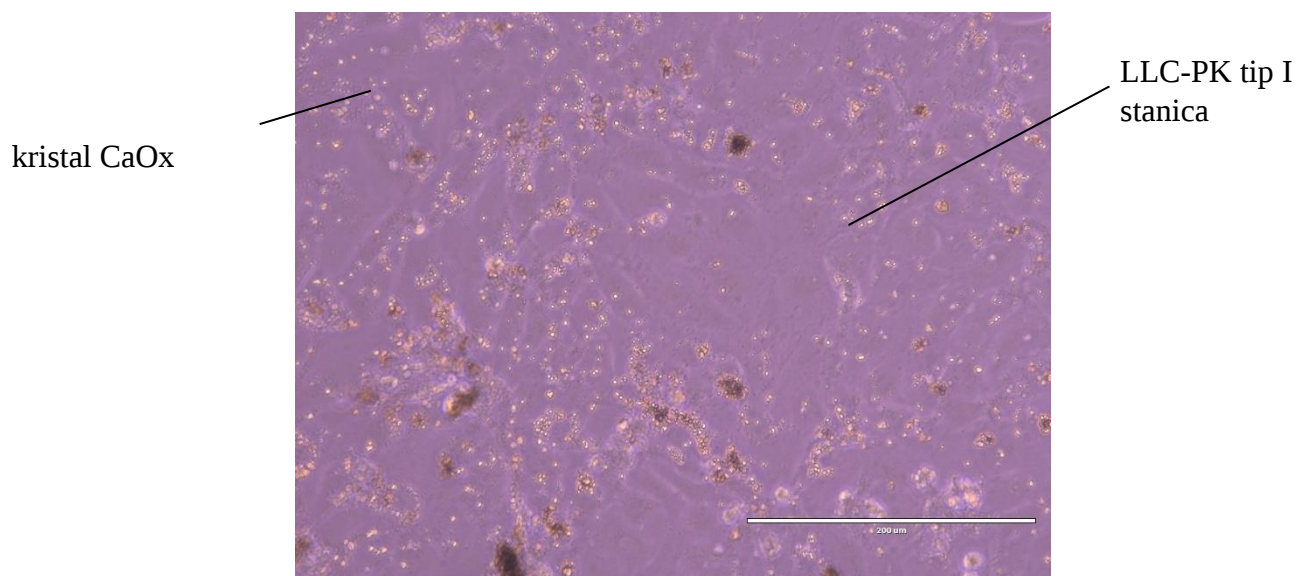


*Slika 15. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kofeinom nakon 24 h*

## 5. REZULTATI

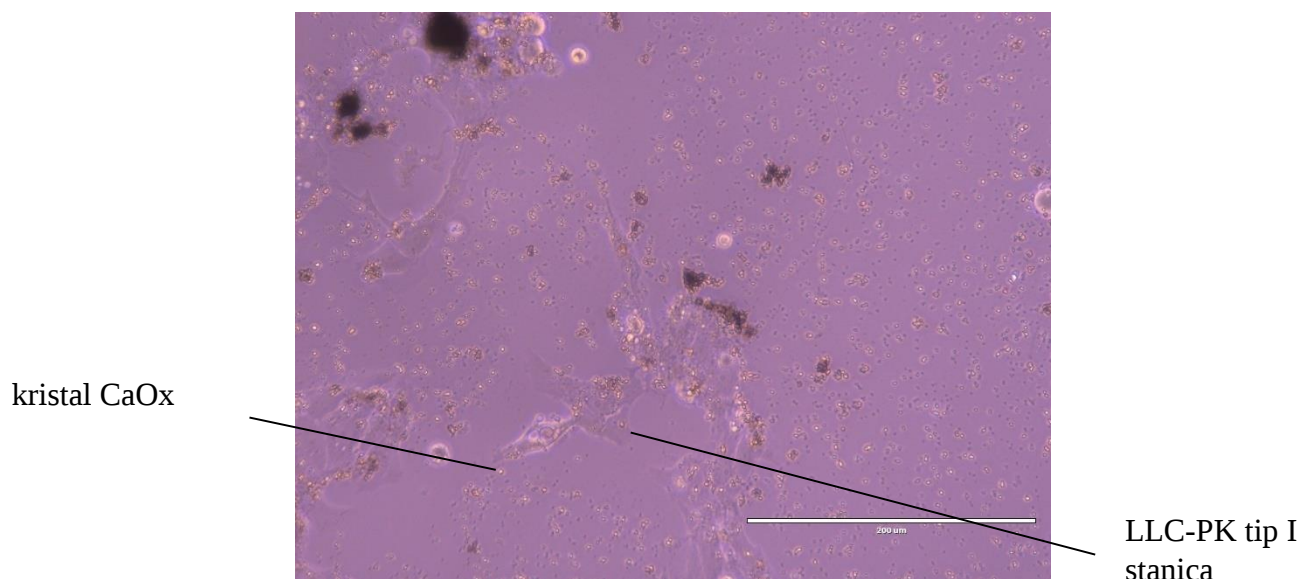


*Slika 16. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 0,1 mM kofeinom nakon 24 h*



*Slika 17. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 1 mM kofeinom nakon 24 sata*

## 5. REZULTATI



*Slika 18. Reprezentativna mikrofotografija stanica tretiranih kristalima kalcijevog oksalata i 10 mM kofeinom nakon 24 sata*

### 5.2. Ispitivanje djelovanja kofeina na stanice LLC-PK tip I

Epitelne stanice proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa LLC-PK tip I izložene su kalcijevom oksalatu i kofeinu određenih koncentracija nakon inkubacije 1 h, 3 h i 24 h te je sadržaj svake jažice prebačen u Neubauerov hemocitometar. Onda se pod srednjim povećanjem izvršilo brojanje vijabilnih stanica pod svjetlosnim mikroskopom. S povećanjem koncentracije kofeina broj vijabilnih stanica povećao se. U šestoj jažici uočen je najveći broj stanica s obzirom na to da je tamo bila dodana najveća koncentracija kofeina. U tablici 2. prikazani su rezultati.

## 5. REZULTATI

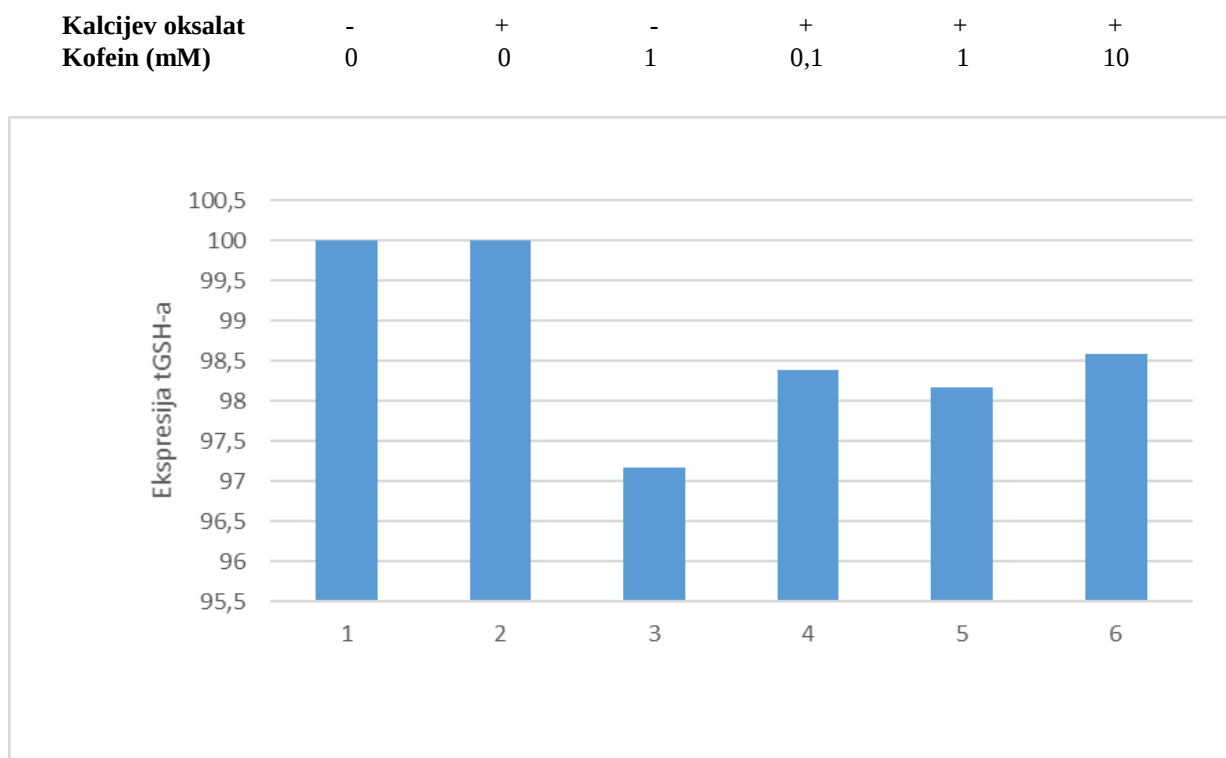
*Tablica 2. Prikaz podataka o koncentraciji vijabilnih stanica LLC-PK tip I u odnosu na koncentraciju kofeina i prisutnost kalcijevog oksalata*

| Broj stanica/ml                                  |                            |                            |                             |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Netretirane stanice                              | 11,5 x 10 <sup>5</sup> (1) | 11,0 x 10 <sup>5</sup> (3) | 10,0 x 10 <sup>5</sup> (24) |
| Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)       | 4,1 x 10 <sup>5</sup> (1)  | 4,3 x 10 <sup>5</sup> (3)  | 4,0 x 10 <sup>5</sup> (24)  |
| Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)         | 4,3 x 10 <sup>5</sup> (1)  | 4,0 x 10 <sup>5</sup> (3)  | 4,0 x 10 <sup>5</sup> (24)  |
| Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)        | 6,5 x 10 <sup>5</sup> (1)  | 6,0 x 10 <sup>5</sup> (3)  | 6,0 x 10 <sup>5</sup> (24)  |
| *vrijeme inkubacije (h) prikazano je u zagradama |                            |                            |                             |

### 5.3. Mjerenje koncentracija glutationa

Rezultati pokazuju manji postotak izraženog ukupnog glutationa u stanica koje su tretirane isključivo kofeinom bez dodanog kalcijevog oksalata (97,18 %) u odnosu na postotak ukupnog glutationa u stanica koje su bile tretirane kalcijevim oksalatom i kofeinom u koncentraciji 0,1 mM (98,39 %), 1 mM (98,18 %) te 10 mM (98,59 %). Stanice tretirane kalcijevim oksalatom i netretirane stanice ukazale su na stopostotni učinak izraženog GSH-a.

## 5. REZULTATI



*Slika 19. Prikaz odnosa postotka ekspresije tGSH-a nakon dodanog kalcijevog oksalata i rastuće koncentracije kofeina. 0,1, 1 i 10 predstavljaju koncentraciju kofeina u mM. U prvoj i drugoj jažici nije prisutan kofein te je označeno s 0. – označava da kalcijev oksalat nije prisutan u prvoj i trećoj jažici. U jažicama u kojima je prisutan kalcijev oksalat označeno je s +.*

## 5. REZULTATI

*Tablica 3. Prikaz odnosa aritmetičke sredine, standardne devijacije i postotka ekspresije tGSH-a na tretiranost stanica kalcijevim oksalatom i kofeinom*

|                                                   | <b>Aritmetička sredina</b> | <b>Standardna devijacija</b> | <b>Ekspresija tGSH-a / netretirane stanice (%)</b> |
|---------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Netretirane stanice</b>                        | 0,3907                     | 0,003394                     | 100                                                |
| <b>Stanice tretirane CaOx</b>                     | 0,3907                     | 0,001131                     | 100                                                |
| <b>Stanice tretirane kofeinom (1 mM)</b>          | 0,3797                     | 0,00099                      | 97,18                                              |
| <b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (0,1 mM)</b> | 0,3844                     | 0,001131                     | 98,39                                              |
| <b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (1 mM)</b>   | 0,3836                     | 0                            | 98,18                                              |
| <b>Stanice tretirane CaOx i kofeinom (10 mM)</b>  | 0,3852                     | 0                            | 98,59                                              |

### 6. RASPRAVA

Urolitijaza, jedna od najčešćih bolesti urinarnog trakta u kojoj dolazi do stvaranja kamenaca u mokraćnom sustavu, nastaje kao posljedica prekomjernog izlučivanja slabo topljivih tvari mokraćom. Kristalizacija predstavlja prvu fazu u stvaranju kamenaca, procesu ovisnom o prezasićenosti mokraće i prisutnosti različitih inhibirajućih ili promovirajućih tvari. Hiperoksalurija oksidativnim stresom dovodi do oštećenja membranskih lipida i proteina na epitelnim stanicama, stvarajući time preduvjete za retenciju kristala u bubregu. Bolest bubrežnih kamenaca globalni je zdravstveni problem s visokom stopom recidiva i nakon uklanjanja kamenaca. Rizičnim čimbenicima u patogenezi smatraju se genetska predispozicija, nizak pH urina, mali urinarni volumen (36 - 37).

Osobama s dijagnosticiranom urolitijazom na raspolaganju stoje dvije skupine lijekova, NSPL koji smanjuju proizvodnju prostaglandina čija je jedna od funkcija u tijelu povećanje osjetljivosti receptora boli na mehaničke i kemijske podražaje te opiodi koji svoj analgetski učinak ostvaruju mehanizmom sprječavanja pohrane serotonina i noradrenalina. ESWL predstavlja danas standardnu metodu u liječenju urolitijaze na minimalno invazivni način i primjenjuje se praktički na svakoj urološkoj klinici ili odjelu, kao primarni postupak terapije kamenaca mokraćnog sustava (38 - 40). Stoga je ključno razviti učinkovite strategije za sprječavanje stvaranja novih ili rekurentnih kamenaca te se traži adekvatna terapija kojom bi se mogla spriječiti urolitijaza te posljedična oštećenja dijelova mokraćnog sustava (38).

Procjena prehrane ima značajnu ulogu i u liječenju i u prevenciji nastanka bubrežnih kamenaca. Isto tako, visok unos proteina, natrija i kalcija, kao i visok unos oksalata pogoduju nastanku kamenaca. Također, ranije studije dokazale su kako povećani unos citrata i kalija ima protektivnu ulogu. Opće prehrambene smjernice za prevenciju bubrežnih kamenaca uključuju nadalje i unos vode u količini iznad 2,5 l na dan (41 - 45).

Epidemiološke studije izvijestile su o rezultatima vezanima za utjecaj kofeina kao antioksidansa na urolitijazu. Sugeriraju da je unos kofeina povezan sa smanjenim rizikom od urolitijaze te da je jedna od mogućnosti za liječenje u tu svrhu. U istraživanju Kizivata i suradnika istraživao se utjecaj antioksidansa (vitamina E i L-arginina) na prevenciju oksidativnog oštećenja u endotelnim stanicama sabirnog tubula bubrega. Predtretman tim antioksidansima uzrokovao je povećanu vijabilnost stanica koje su zatim bile tretirane

## 6. RASPRAVA

natrijevim oksalatom. Njihovi rezultati sugerirali su da bi se oni mogli koristiti kao preventivna terapija u bolestima bubrežnih kamenaca (35).

Prethodne retrospektivne i prospektivne studije pokazale su da kofein djeluje diuretski, tj. da povećava izlučivanje kalcija iz urina. Uostalom, i tri velike kohortne studije sugerirale su preventivnu ulogu kofeina u bolesti bubrežnih kamenaca, studija zdravstvenih radnika, zdravstvena studija medicinskih sestara (NHS I) i druga skupina medicinskih sestara (NHS II) s ukupno više od 200 000 sudionika. Zaključak tih studija bio je da je konzumacija kofeinskih pića povezana s manjim rizikom (26 – 31 %) od bolesti bubrežnih kamenaca (30, 46).

Istraživanje Massey LK, Sutton RA koje je ispitivalo akutni utjecaj kofeina na sastav mokraće i rizik od pojave bubrežnog kamena formiranog od kalcijevog oksalata potvrdilo je svoju hipotezu da se konzumacijom kofeina može smanjiti rizik od stvaranja kamenaca kalcijevog oksalata. Ukupno 39 normokalcemičnih pacijenata konzumiralo je kofein nakon 14 sati gladovanja te se sastav urina uspoređivao 2 sata prije i 2 sata nakon konzumacije kofeina (47 - 49).

Glavni ciljevi ove stručno istraživačke studije bili su utvrditi zaštitni utjecaj kofeina u zaustavljanju kristalizacije kalcijevog oksalata u staničnom modelu urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula LLC-PK tip I. Koristili smo kalcijev oksalat kao jedan od najčešćih konstituenata bubrežnih kamenaca. Odredili smo razinu opterećenja stanica slobodnim radikalima mjerenjem koncentracija glutationa (GSH) nakon tretmana kalcijevim oksalatom i kofeinom. Kofein je pokazao kako ima povoljan utjecaj na smanjenje nastanka oksidativnog oštećenja stanica u usporedbi sa stanicama u kojima nije bilo tretmana s kofeinom po razini koncentracije ukupnog glutationa.

Rezultati vijabilnosti stanica pokazali su, u uvjetima gdje su stanice bile tretirane i kofeinom osim kristalima kalcijevog oksalata, da su više vrijednosti preživljenja stanica proporcionalne s porastom primijenjene koncentracije kofeina.

Tijekom ispitivanja utjecaja kofeina na toksičnost kalcijevog oksalata na LLC-PK tip I stanice uočeno je proporcionalno smanjenje porasta broja kristala s porastom dodane koncentracije kofeina. Iz navedenog možemo potvrditi da je oksidativno oštećenje smanjeno u prisutnosti većih koncentracija kofeina i općenito smanjivanje kristalizacije. Najveća koncentracija kofeina, 10 mM imala je najveći zaštitni učinak u staničnom modelu.

## 6. RASPRAVA

Prethodno istraživanje potvrdilo je da kofein sprječava formiranje bubrežnog kamenca premještajući se u citoplazmu proteina kristala vezanjem apikalnog površinskog aneksina A1. Procijenjeni su zaštitni učinci kofeina na formaciji bubrega kamenca kalcijevog oksalata monohidrata te su rezultati pokazali da je kofein smanjio broj kristala, ali s druge strane povećao veličinu kristala, rezultirajući nepromijenjenom kristalnom masom. Rezultati su pokazali da kofein nema nikakvog utjecaja na rast kristala kalcijevog oksalata. To nije bilo neočekivano, jer je kofein purinska baza u metilksantinskoj obitelji, koja ima vrlo nizak afinitet za vezanje kalcija. Stoga, malo je vjerojatno bilo da kofein može izravno interferirati u kristalnu molekularnu strukturu. Prethodne studije pokazale su da kofein povećava urinarno izlučivanje limunske kiseline, koja se smatra jednim od nekoliko inhibitora rasta kristala kalcijevog oksalata (30, 50 - 52).

Podatci u našoj studiji pokazali su da smanjivanje broja kristala ovisi jednako i o koncentraciji kofeina kao i o vremenu inkubacije te je relativno duža inkubacija potrebna kako bi se ostvarilo zaustavljanje kristalizacije. Dobiveni rezultati u skladu su s objavljenim studijama koje su pokazale kako kofein ima povoljno djelovanje na stanice uslijed izloženosti kalcijevog oksalata. Istraživanja kliničke važnosti urolitijaze i terapijskih implikacija kontinuirano se razvijaju te je utvrđeno kako i prehrana s unosom kalcija i nadomjesci kalcija imaju pozitivan utjecaj u liječenju urolitijaze i osteoporoze. Bifosfonati koji se koriste kao uobičajena terapija osteoporoze inhibiraju stvaranje kalcijevih kamenaca, dok se učinak antioksidansa treba istražiti (53). Stoga će slijedom dobivenih zaključaka izvedenim na Katedri za farmakologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku, učinci kofeina biti korisni klinički, posebno ako se daju u kombinaciji s uobičajenom terapijom. Daljnja istraživanja trebala bi se provesti na kamencima različitih drugih kemijskih sastava od kojih mogu biti formirani.

Konačno, kofein predstavlja obećavajuću kako preventivnu tako i zaštitnu terapiju te zaslužuje daljnja istraživanja na tom području kako bi se omogućila dodatna i učinkovitija rješenja. Uporaba kofeina u kombinaciji s uobičajenim načinima liječenja protiv urolitijaze može dati još bolju učinkovitost u samom liječenju. To ostavlja otvoren prostor za daljnja istraživanja.

### 7. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata koje smo dobili istražujući djelovanje kofeina pri nastanku oksidativnog oštećenja i kristalizacije u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula (LLC-PK tip I) mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- kofein ima mogućnost zaštitnog djelovanja na stanice proksimalnih bubrežnih tubula smanjujući rast kristala kalcijevog oksalata i prestanak daljnje kristalizacije
- sposobnost oksidativnog oštećenja u kojem dolazi do odumiranja stanica ima kalcijev oksalat
- ekspresija ukupnog glutatona je najviše povišena kod najveće koncentracije kofeina te je indikator zaštitnog učinka kofeina na stanice proksimalnih bubrežnih tubula kojima je povećana vijabilnost proporcionalna s porastom koncentracije kofeina.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Utvrditi toksični učinak kalcijevog oksalata na epitelnim stanicama proksimalnih bubrežnih tubula staničnog tipa LLC-PK tip I i procijeniti učinkovitost različitih koncentracija kofeina u zaustavljanju kristalizacije kalcijevog oksalata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze. Odrediti razinu opterećenja stanica slobodnim radikalima mjerenjem koncentracija glutaciona (GSH) nakon tretmana kalcijevim oksalatom i kofeinom.

**Nacrt studije:** Stručna istraživačka studija

**Materijali i metode:** Korištena stanična kultura je *Lilly Laboratories Cell Porcine Kidney*, stanična linija proizvedena iz bubrega normalne, zdrave muške svinje (*Sus scrofa*) između 3. i 4. tjedna starosti. Od kemikalija korišten je kofein (Sigma) te kalcijev oksalat (Sigma-Aldrich). Stanice su uzgajane u pločama sa šest jažica te su tretirane kalcijevim oksalatom i kofeinom u odgovarajućim koncentracijama. Nakon inkubacije svjetlosnom mikroskopijom pratio se nastanak kristalizacije i utjecaj djelovanja kofeina nakon jednog, tri i 24 sata te su se učinile mikrofotografije EVOS™ FL Color mikroskopom. Koncentracija ukupnog glutaciona izmjerena je spektrofotometrijski pomoću komercijalno dostupnog kita (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD). Vijabilnost stanica u suspenziji utvrdila se ekskluzijskim testom *Trypan Blue* bojom (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) uz pomoću Neubauerovog hemocitometra svjetlosnom mikroskopijom.

**Rezultati:** Proporcionalnim povećanjem koncentracije, kofein zaustavlja kristalizaciju kalcijevog oksalata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula – LLC-PK tip I. Kofein kao potencijalna zaštitna terapija uzrokuje značajno preživljenje stanica. Ekspresija ukupnog glutaciona pokazala je da oksidativno oštećenje stanica koje su tretirane samo kalcijevim oksalatom veće u odnosu na stanice koje su tretirane, osim kalcijevim oksalatom, i kofeinom.

**Zaključak:** Kofein sprječava nastanak kristalizacije kalcijevog oksalatnog monohidrata u staničnom modelu oksalatne urolitijaze proksimalnih bubrežnih tubula – LLC-PK tip I.

**Ključne riječi:** glutation; kalcijev oksalat; kofein; LLC-PK tip I; urolitijaza

### 9. SUMMARY

#### **Effects of caffeine on prevention of damage caused by free radicals in cellular model of oxalate urolithiasis of proximal renal tubules (LLC-PK type I)**

**Objectives:** The aim of this study was to determine the toxicity of calcium oxalate on epithelial cells of proximal kidney types LLC-PK type I, evaluate the effect of different caffeine concentrations in stopping the crystallization of calcium oxalate in the cellular model of oxalate urolithiasis of proximal kidney tubules – LLC-PK type I. Furthermore, the aim was to determine the level of cell loading by free radicals by measuring the glutathione concentration (GSH) after the treatment with calcium oxalate and caffeine and to determine cell viability with increased caffeine concentrations.

**Study design:** Laboratory research study

**Materials and methods:** The used cell culture is the Lilly Laboratories Cell Porcine Kidney, a cell line produced from the kidney of a normal, healthy male pig (*Sus scrofa*) between 3 and 4 weeks of age. The chemicals used included caffeine (Sigma) and calcium oxalate (Sigma-Aldrich). The cells were cultured in six-well plates and treated with calcium oxalate and caffeine at appropriate concentrations. After incubation at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, light microscopy followed the formation of crystallization and the effect of caffeine activity after one, three and 24 hours, and EVOS™ FL Color microscope was used to make microphotographs. Total Glutathione Concentration (GSH) was measured spectrophotometrically by using a commercially available kit (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The cell susceptibility in suspension was determined by an exclusive Trypan Blue dye (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) using Neubauer's hemocytometer by means of medium-light microscopy.

**Results:** By the proportional increase in concentration, caffeine stops the crystallization of calcium oxalate in the cellular model of oxalate urolithiasis of proximal kidney tubules – LLC-PK type I. Caffeine as a potential protective therapy causes significant cell survival. Overall glutathione expression showed that oxidative damage to cells treated only with calcium oxalate was higher compared to cells treated by both calcium oxalate and caffeine.

**Conclusion:** Caffeine prevents crystallization of calcium oxalate monohydrate in the cellular model of oxalate urolithiasis of proximal kidney tubules LLC-PK type I.

**Keywords:** caffeine; calcium oxalate; glutathione; LLC-PK1; urolithiasis

## 10. LITERATURA

1. Šitum M, Gotovac J, i sur. Urologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
2. Turk C, Knoll T, Petrik A, Sarica K, Seitz C, Skolarikos A, et. al. Guidelines on urolithiasis in European Association of Urology. Eur Urol 2014 Nov 20; 2016.
3. Tiselius HG, Ackermann D, Alken P, Buck C, Conort P, Gallucci M. Etiology and investigation of stone disease. Curriculum in Urology. Eur Urol. 1998;2(1):1-7.
4. Rahelić D, Sotošek S, Galić J, Fučkar Ž. Urolitijaza. U: Fučkar Ž, Španjol J i sur. Urologija II. izd. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2013:289-330.
5. Evan A, Worcester E, Coe F, et. al. Mechanisms of human kidney stone formation Urolithiasis. 2015;43(1):19-32.
6. Pak CY, Adams-Huet B, Poindexter JR, Pearle MS, Peterson RD, Moe OW. Rapid communication: relative effect of urinary calcium and oxalate on saturation of calcium oxalate. Kidney Int. 2004;66(5):2032-7.
7. Talati JJ, Tiselius HG Albala DM, Ye Z. Urolithiasis: Basic Science and Clinical Practice. 1. izd. London, UK, Springer Science & Business Media; 2012.
8. Massey LK, Roman-Smith H, Sutton R. Effect of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of calcium oxalate kidney stones. J Am Diet Assoc. 1993;93:901-6.
9. Tolley DA, Segura JW. Urinary stones. Oxford: Health press. 2002.
10. López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. Pediatr. Nephrol. 2010;25 49.
11. Heller HJ, Ooerner MF, Brinkley LJ. Effect of dietary calcium on stone forming propensity. J Uro/; 2003;169(2):470-4.
12. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family History and Risk of Kidney Stoned. I Am Soc Nephrol. 1997;8:1568-1573.
13. Stoller ML. Urinary stone diseases. U: Tanagho EA, McAninch JW. Smith' s general urology. New York: Lange Medical Books. 200:291-320.

## 10. LITERATURA

14. Langston C, Gisselman K, Palma D, McCue J. Diagnosis of Urolithiasis. *Compend Contin Educ Vet.* 2008;30(8):447-50, 452-4.
15. Miller OF, Rineer SK, Reichard SR, Buckley Rg, Donovan MS, Graham IR, et al. Prospective comparison of unenhanced spiral computed tomography and intravenous urogram in the evaluation of acute flank pain. *Urology.* 1998;52(6):982-7.
16. Yilmaz S, Sindel T, Arslan G, Ozkaynak C, Karaali K, Kabaalioglu A, et. al. Renal colic: comparison of spiral CT, US and IVU in the detection of ureteral calculi. *Eur Radiol.* 1998;8:212-7.
17. Pareek G, Hedican SP, Lee FT Jr, Nakada SY. Shock wave lithotripsy success determined by skin-to-stone distance on computed tomography. *Urology.* 2005;66:941-944.
18. Rodgers AL, Lewandowski S. Effects of 5 different diets on urinary risk factors for calcium oxalate kidney stone formation: Evidence of different renal handling mechanisms in different race groups. *J Urol.* 2002;168:931-6.
19. Knoll T. Epidemiology, pathogenesis, and pathophysiology of urolithiasis. *European Urology Supplements.* 2010;9(12):802-806.
20. Gul Z, Monga M. Medical and dietary therapy for kidney stone prevention. *Korean Journal of Urology.* 2014 Dec; 55(12):775-779.
21. Moe OW, Pearle MS, Sakhaee K. Pharmacotherapy of urolithiasis: evidence from clinical trials. *Kidney Int.* 2011;79(4):385-92.
22. Hongshi X, Zisman AL, Coe F L, Worcester EM. Kidney stones: Un update on current pharmacological management and future directions. *Expert Opin Pharmacother.* 2013; 14:435-447.
23. Porena M, Guiggi P, Micheli C. Prevention of stone disease. *Urol Int.* 2007;79:37-6.
24. Trinchieri A, Montaneri E. Prevalence of renal uric acid stones in the adult. *Urolithiasis.* 2017;45(6):553-562.
25. Taylor E, Curhan G. Diet and fluid prescription in stone disease *Kidney International.* 2006;70(5):835-9.
26. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods:

## 10. LITERATURA

- a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010;75(3):77-87.
27. Graham H.N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 1992;21:334–350.
28. Taylor EN, Curhan GC. Role of nutrition in the formation of calcium-containing kidney stones. *Nephron Physiol.* 2004;98(2):55-3.
29. Ferraro PM, Taylor EN, Gambaro G, Curhan GC. Caffeine intake and the risk of kidney stones *Am J Clin Nutr.* 2014 Dec;100(6):1596-603.
30. Peerapem P, Thongboonkerd V. Caffeine prevents kidney stone formation by translocation of apical surface annexin A1 crystal-binding protein into cytoplasm: In vitro evidence. *Sci Rep.* 2016;6(1):38536.
31. Peraapen P, Thongboonkerd V. Caffeine in Kidney stone Disease: Risk or Benefit? *Adv Nutr.* 2018 Jul 1;9(4):419-424.
32. Nielsen R, Birn H, Moestrup SK, Nielsen M, Verroust P, Christensen EL. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Oct;9(10):1767-76.
33. Thermo Fisher Scientific. Guidelines for Maintaining Cultured Cells. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/maintaining-cultured-cells.html>. Datum pristupa: 22.2.2019.
34. Piccinini F, Tesei Anna, Arienti C, Bevilacqua A. Cell counting and viability assessment of 2D and 3D cell cultures: Expected reliability of the trypan blue assay. *Biol proced online.* 2017;19:8.
35. Kizivat T, Smolić M, Marić I, Tolušić Levak M, Smolić R, Bilić Čurčić I, et al. Antioxidant Pre-Treatment Reduces the Toxic Effects of Oxalate on Renal Epithelial Cells in a Cell Culture Model of Urolithiasis. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(1):109.
36. Romero V, Akpınar H, Assimos D. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Reviews in urology.* 2010;86-96.

## 10. LITERATURA

37. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis in Archivio italiano di urologia, andrologia: organo ufficiale di Società italiana di ecografia urologica e nefrologica/Associazione ricerche in urologia; 1996.
38. Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ. Risk factors in calcium stone Disease of the urinary tract. Br J Urol. 1978;50:449-4.
39. Oguić R, Dimec D, Markić D. Urolitijaza-prevencija, dijagnostika i liječenje. Medicina 2004;42(40):95-102.
40. Tiselius HG. Aetiology and investigation of stone disease. Curriculum in Urology. Eur Urol .1998;2(1):1-7.
41. Curham G, Curhan S. Dietary factors and kidney stone formation. Compr Ther. 1194.20(9):485-9.
42. Hesse AT, Tiselius H-G, Siener R. Urinary Stones, Diagnosis, Treatment and Prevention of Recurrence. 3Rd edn. Basel, S. Karger AG; 2009. ISBN 978-3-8055-9149-2.
43. Galić J, Perković J. Pristup liječenju urolitijaze. Medix. 2010;91:180-183.
44. Massey LK, Sutton RA. Acute caffeine effects on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. J Urol. 2004 Aug;172(2):555-8.
45. Božidar V, i sur. Interna medicina. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
46. Šerić V. Biomarkeri bubrežnog oštećenja u razvoju kalcij oksalatne urolitijaze (Doktorska disertacija). Medicinski fakultet Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2012.
47. Massey LK, Sutton RA. Acute caffeine effect on urine composition and calcium kidney stone risk in calcium stone formers. J Urol. 2004;172(2):555-8.
48. Soueidan M, Bartlett SJ, Noureldin YA, Andersen RE, Andonian S. Leisure time physical activity, smoking and risk of recent symptomatic urolithiasis: Survey of stone clinic patients. Can Urol Assoc J. 2015;9:257–262.
49. Costa-Bauza A, Grases F, Calvó P, Rodriguez A, Prieto R. Effect of Consumption of Cocoa-Derived Products on Uric Acid Crystallization in Urine of Healthy Volunteers. Nutrients. 2018;10(10):1516.

## 10. LITERATURA

50. Spivacow FR, Del Valle EE, Lores E, Rey PG. Kidney stones: composition, frequency and relation to metabolic diagnosis, *Medicina (B Aires)*. 2016;76:343-348.
51. Worcester EM, Coe FL. Calcium Kidney Stones. *N Engl J Med*. 2010;363(10):954–63.
52. Davalos M, Konno S, Eshghi M, Choudhury M. Oxidative renal cell injury induced by calcium oxalate crystal and renoprotection with antioxidants: a possible role of oxidative stress in nephrolithiasis. *J Endourol*. 2010;24(3):339-45.
53. Bilić-Ćurčić I, Milas-Ahić J, Smolić M, Smolić R, Mihaljević I, Tucak-Zorić S. Urolithiasis and osteoporosis: clinical relevance and therapeutic implications. *Coll Antropol*. 2009;33 Suppl 2:189–92.

## 11. ŽIVOTOPIS

ANITA CINDRIĆ

Stjepana Radića 272

35253 Brodski Stupnik

Hrvatska

(+385) 91 161 4646

[anicindric@gmail.com](mailto:anicindric@gmail.com)

### OBRAZOVANJE

Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika (Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku)

Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika (Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci)

Gimnazija "Matija Mesić", jezično usmjerenje

### RADNO ISKUSTVO

KBC Sestre milosrdnice – Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, Endokrinološki laboratorij

KB Dubrava – Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za transfuzijsku medicinu, Centar za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije

### ČLANSTVO

Hrvatska udruga studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike – CMLDSA

## 11. ŽIVOTOPIS

Hrvatska komora zdravstvenih radnika - strukovni razred za medicinsko laboratorijsku djelatnost

### IZDANJA

- Preživljavanje legionela u primarnoj kulturi humanih polimorfonuklearnih stanica. Cindrić, Anita; Jurčić Momčilović, Diana; Sorić, Monika; Gobin, Ivana. Hrvatska znanstvena bibliografija (CROSBI), Liječnički vjesnik/Anić, Branimir i (ed). – Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, 2012. 47 – 47.

Sudjelovanje na *12<sup>th</sup> Zagreb International Medical Summit* od 14. do 17. studenog 2012. radom *The survival of Legionella in Human Polymorphonuclear Granulocytes*