

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Maro Bujak

Uloga signalnog puta p38 MAPK u razvoju Dupuytrenove kontrakture

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Maro Bujak

Uloga signalnog puta p38 MAPK u razvoju Dupuytrenove kontrakture

Doktorski rad predložen
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne
doktorske studije zbog stjecanja akademskog stupnja
doktora znanosti

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

Uloga signalnog puta p38 MAPK u razvoju Dupuytrenove kontrakture

Maro Bujak

Rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković, Zagreb

Mentori: *doc.dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić*
Prof.dr. sc. Mirela Baus Lončar

Kratki sažetak doktorskog rada:

Bolje razumijevanje patogeneze fibroznih bolesti važno je za otkrivanje novih dijagnostičkih i terapijskih meta. Koristeći primarne stanične kulture pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture istražena je uloga p38 MAPK signalnog puta u nastanku ove fibroze. Dobiveni rezultati su pokazali da TGF- β 1 potiče ekspresiju različitih fibroznih gena: α -SMA, ED-A FN, PALLD, COL1A1, ARHGDI, IGFR-1, THBS-1, PAI-1, TIMP-1, CCL11 i IL-6. Inhibicija fosforilacije p38 MAPK specifičnim inhibitorom u potpunosti inhibira nizvodnu signalnu kaskadu preko inhibicije MAPKAPK-2 kinaze što je dovelo do smanjene ekspresije gena: PALLD, α -SMA, THBS-1, PAI-1, TIMP-1 i CCL11. Također, TGF- β 1-posredovana kontrakcija fibroblasta uzgojenih u kolagenskom gelu je ovisna o aktivaciji/fosforilaciji p38. Inhibicija signalnog puta p38 MAPK mogla bi predstavljati novi terapijski pristup u liječenju Dupuytrenove kontrakture, posebno u prevenciji recidiva nakon operativnog zahvata.

Broj stranica: 133

Broj slika: 27

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 218

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Dupuytrenova kontraktura, miofibroblasti, TGF- β 1, p38 MAPK

Datum obrane: 19. lipnja 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof. dr. sc. Đurđica Ugarković**, redovni profesor, predsjednik
2. **Doc.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić**, docent, mentor I
3. **Prof.dr.sc. Mirela Baus Lončar**, Izv. Profesor, mentor II
4. **doc.dr.sc. Inga Marijanović**, docent
5. **dr.sc. Aleksandra Fučić**, znanstveni savjetnik
6. **zamjenski član: doc.dr.sc. Monika Lovrek**, docent

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek;
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biomedicine and Health
Scientific Field: Basic Medical sciences

Role of p38 MAPK signalling pathway in development of Dupuytren's disease

Maro Bujak

Thesis performed at Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Supervisors: *Sandra Kraljević Pavelić, PhD, professor*
Mirela Baus Lončar, PhD, MD, professor

Short abstract:

Better understanding of fibrosis pathogenesis is crucial for discovery of novel diagnostic and therapeutic targets. Therefore, the role of p38 MAPK signalling pathway in DD was assessed in this study on the primary cell culture model. Obtained results reveal that treatment of cells by TGF- β 1 successfully induced activation of various fibrotic genes, *i.e.* α -SMA, ED-A FN, PALLD, COL1A1, ARHGDI1, IGFR-1, THBS-1, PAI-1, TIMP-1, CCL11 and IL-6. Moreover, inhibition of p38 phosphorylation inhibited phosphorylation of MAPKAPK-2 kinase that led to decreased expression of fibrotic genes PALLD, α -SMA, THBS-1, COL1A1, ED-A FN, PAI-1, TIMP-1 and CCL11. In line with these results, we managed to measure increased fibroblast contractility upon TGF- β 1 treatment and decreased contractility of cells upon inhibition of p38 phosphorylation. Inhibition of p38 MAPK signalling pathway may provide a novel therapeutic avenue for the treatment of Dupuytren's disease.

Number of pages: 133

Number of figures: 27

Number of tables: 11

Number of references: 218

Original in: Croatian

Key words: Dupuytren's disease, myofibroblasts, TGF- β 1, p38 MAPK

Date of the thesis defense: 19. June 2013.

Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Đurđica Ugarković, full professor, president
2. Doc.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić, assistant professor
3. Prof.dr.sc. Mirela Baus Lončar, associate professor
4. doc.dr.sc. Inga Marijanović, assistant professor
5. dr.sc. Aleksandra Fučić, scientific adviser
6. substitute member: doc.dr.sc. Monika Lovrek, assistant professor

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek;
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za Sistemska biomedicinu Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić i prof. dr. sc. Mirela Baus Lončar u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Molekularna obilježja miofibroblasta Dupuytrenove kontrakture “ kojega je voditelj prof. dr. sc. Krešimir Pavelić.

SADRŽAJ:

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. LITERATURNI PREGLED | 4 |
| 2.1 Mehanizmi nastanka fibroproliferativnih bolesti | 5 |
| 2.2 Dupuytrenova kontraktura | 6 |
| 2.3 Faze bolesti Dupuytrenove kontrakture | 8 |
| 2.4 Etiologija Dupuytrenove kontrakture | 10 |
| 2.4.1 Genetski čimbenici rizika | 10 |
| 2.4.2 Okolišni čimbenici rizika | 11 |
| 2.4.3 Bolesti | 12 |
| 2.5 Liječenje | 12 |
| 2.6 Vezivno tkivo | 14 |
| 2.7 Morfologija i uloga miofibroblasta u Dupuytrenovoj kontrakturi | 16 |
| 2.8 Komponente izvanstaničnog matriksa | 18 |
| 2.8.1 Kolagen | 18 |
| 2.8.2 Glikoproteini | 21 |
| 2.8.3 Proteoglikani | 23 |
| 2.8.4 Matriks metaloproteinaze i inhibitori | 24 |
| 2.9 Dupuytrenova kontraktura i imunološki odgovor (upala) | 26 |
| 2.9.1 Kemokini, citokini i čimbenici rasta | 27 |
| 2.10 Globalne metode u istraživanju mehanizama nastanka Dupuytrenove kontrakture | 33 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 36 |
| 3.1 Uzorci i ispitanici | 37 |
| 3.2 Uzgoj stanica <i>in vitro</i> | 37 |
| 3.3 Model primarnih stanica <i>in vitro</i> | 38 |
| 3.4 Western blotting | 39 |
| 3.4.1 Izolacija ukupnih staničnih proteina | 39 |
| 3.4.2 Kvantifikacija proteina | 39 |
| 3.4.3 SDS-poliakrilamidna-gel elektroforeza | 40 |
| 3.4.4 Imunokemijska detekcija | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5 Izolacija ukupne RNK iz stanica | 40 |
| 3.6 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) | 42 |
| 3.6.1 Reverzna transkripcija | 43 |
| 3.6.2. „qRT –PCR“ | 43 |
| 3.7 Ekspresija gena vezanih za upalne i autoimune bolesti | 45 |
| 3.8 Analiza proteina primarnih kultura stanica izlučenih u hranjivi medij | 48 |
| 3.8.1 Izolacija izlučenih proteina iz hranjivog medija | 48 |
| 3.8.2 Priprema uzoraka za analizu na spektrometru masa | 49 |
| 3.8.3 Identifikacija proteina primarnih kultura stanica izlučenih u hranjivi medij uz pomoć spektrometrije masa | 50 |
| 3.8.4 Pretraživanje baze podataka u svrhu identifikacije proteina | 52 |
| 3.9 Određivanje kontrakcije primarnih stanica u kolagenskom gelu | 53 |
| 3.9.1 Priprema otopine kolagena | 53 |
| 3.9.2 Titracija kolagena s NaOH | 53 |
| 3.10 Određivanje polimorfizama gena za IL-6 (174 G/C) rs1800795, IL-6 (572 G/C) rs1800796 i IL-6 (597 A/G) rs1800797 | 54 |
| 3.10.1 Izolacija DNK | 54 |
| 3.10.2 Određivanje polimorfizama metodom qRT-PCR | 54 |
| 4. REZULTATI | 57 |
| 4.1 Primarne stanične kulture | 58 |
| 4.2 Analiza ekspresije kinaze MAPKAPK-2 u stanicama ND prije i nakon inhibicije signalnog puta p38 MAPK uz pomoć metode Western blot | 60 |
| 4.3 Određivanje ekspresije pro-fibroznih gena metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom u realnom vremenu (qRT-PCR) | 62 |
| 4.3.1 Kvaliteta izolirane RNK | 62 |
| 4.3.2 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (qRT-PCR) | 63 |
| 4.4 Ekspresija gena uključenih u upalne i autoimune bolesti | 67 |
| 4.5 Rezultati gel elektroforeze 1-DE i masene spektrometrije | 76 |
| 4.6 Ekspresija gena ekstracelularnih produkata PAI-1 i TIMP-1 | 78 |

| | |
|--|------------|
| 4.7 Određivanje kontrakcije kolagena | 82 |
| 4.8 Polimorfizmi gena za IL-6 | 84 |
| 4.8.1 Analiza haplotipskog bloka polimorfizama rs1800597, rs1800795 i rs1800796 | 86 |
| 5. RASPRAVA | 88 |
| 6. ZAKLJUČAK | 106 |
| 7. LITERATURA | 108 |
| POPIS KRATICA | 127 |
| SAŽETAK | 128 |
| SUMMARY | 129 |
| ŽIVOTOPIS | 130 |

1. Uvod

Fibroproliferativne bolesti, poput primjerice idiopatske pulmonarne fibroze, ciroze jetra, mijelofibroze, Dupuytrenove kontrakture, hipertrofičkih ožiljaka i keloida su jedan od glavnih uzroka smrti i/ili morbiditeta sa sve većim trendom porasta učestalosti. Općenite značajke ove grupe bolesti su pretjerano nakupljanje vezivnog tkiva te sporo i progresivno propadanje normalne strukture i funkcije zahvaćenih organa. Fibroproliferativni poremećaji se dijele na fibromatoze i fibroze. Fibromatoze su velika skupina benignih oboljenja, površinske i duboke etiologije. Površinske forme se razvijaju iz fascije ili aponeuroze na stopalu (Ledderhoseova bolest), dlanu (Dupuytrenova kontraktura) ili penisu (Peyronieva bolest). Duboke fibromatoze se razvijaju u dubokim mekim tkivima a uključuju izvan-trbušne fibromatoze, unutar-trbušne fibromatoze i fibromatoze trbušnog zida. Podjela samih fibroza je složenija, a organi u kojima se najčešće razvijaju fibroze su pluća, jetra, srce, crijevo, bubreg i koža. Za razliku od fibromatoza, fibroze su mnogo opasnije za ljudsko zdravlje a mogu uzrokovati smrt pacijenta (npr. ciroza jetara uzrokuje 1.5 mil. smrtnih slučajeva godišnje) (Wynn 2007). U terapiji fibromatoza se najčešće primjenjuju operativni zahvati dok se za liječenje fibroza većinom koriste steroidi, imunosupresivi i antifibrozni lijekovi. Nažalost, postojeći vidovi terapije ne daju zadovoljavajuće rezultate. Efikasnost liječenja može se poboljšati boljim razumijevanjem nastanka i razvoja fibroproliferativnih bolesti na molekularnoj razini, te razotkrivanjem uloge upale u fibroproliferativnim oboljenjima (Sivakumar i Das 2008, Stramer i sur. 2007, Wynn 2008).

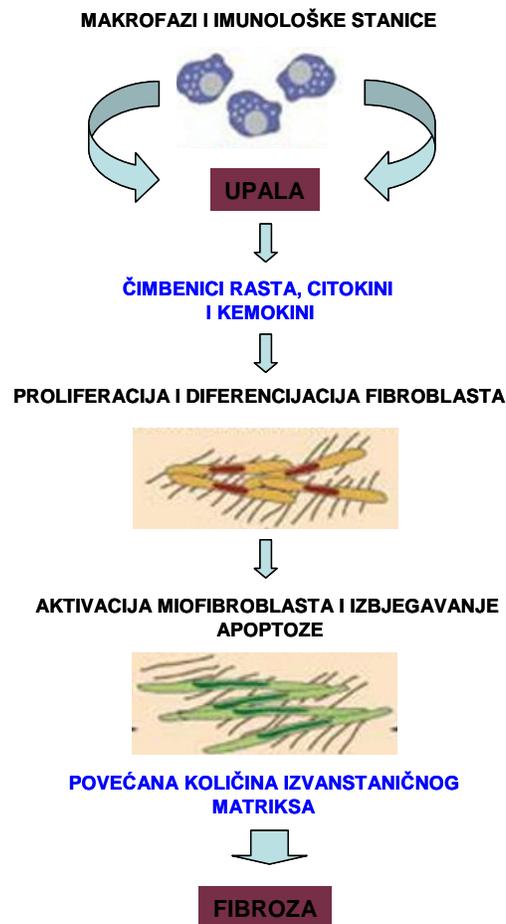
Dupuytrenova kontraktura predstavlja izvrstan model za istraživanje fibroproliferativnih oboljenja na molekularnoj razini jer se prilikom operativnog zahvata uz oboljelo tkivo može odstraniti i makroskopski zdravo nezahvaćeno područje palmarne fascije. Dupuytrenova kontraktura (DK) je benigni fibroproliferativni poremećaj palmarne fascije, karakteriziran ne-malignom transformacijom vezivnog tkiva u dlanu. Etiologija bolesti nije u potpunosti razjašnjena, a bolest se liječi kirurškim zahvatom što ne može osigurati potpuno izlječenje kao ni pojavu recidiva. Bolje razumijevanje patogeneze bolesti važno je u svrhu pronalaženja novih dijagnostičkih i terapijskih meta. Nedavno su

publicirane i globalne studije koje djelomično rasvjetljavaju patogenezu DK, a koje su pratile promjene u ekspresiji gena i proteina uključenih u razvoj i nastanak bolesti. Rezultati tih studija pokazuju kako postoje promjene u obrascu ekspresije gena u bolesnim tkivima, a koje su bile konzistentne s prethodno opisanim pojedinačnim procesima povezanim s razvojem DK. Nažalost, ovi globalni podaci nisu do kraja razjašnjeni u kontekstu biološkog sustava. Stoga je važnost analiza koje su provedene u ovom istraživanju velika jer su se za dio novih podataka vezanih uz razvoj DK koristile mehanističke studije. To znači da su pojedina molekularna zbivanja, točnije uloga signalnog puta p38 MAPK i molekula uključenih u imunološki odgovor, istražena na modelu DK primarnih staničnih kultura *in vitro* uz pomoć modernih globalnih metoda analize (čip analiza, RT-PC i masena spektrometrija). Osobito važan znanstveni doprinos ovog rada je mehanistička studije uloge signalnog puta p38 MAPK u razvoju DK s obzirom kako je u literaturi pokazano da je ovaj signalni put važan za patogenezu nekih drugih, sličnih bolesti, poput primjerice fibroza. Naime, blokiranje ovog signalnog puta djelomično je dokinulo molekularna zbivanja koja vode u pojavu simptoma bolesti što ima velike implikacije za razvoj novih terapijskih pristupa DK. Globalna analiza modulatora imunološkog odgovora pokazala je niz novih molekula uključenih u patogenezu DK što do sada nije objavljeno u znanstvenoj literaturi. Dobiveni rezultati imaju implikacije za iznalaženje novih modaliteta liječenja DK osobito stoga što pacijenti oboljeli od DK osim kirurškog zahvata s velikim postotkom recidiva, nemaju niti jednu drugu adekvatnu opciju za liječenje.

2. Literaturni pregled

2.1 Mehanizmi nastanka fibroproliferativnih bolesti

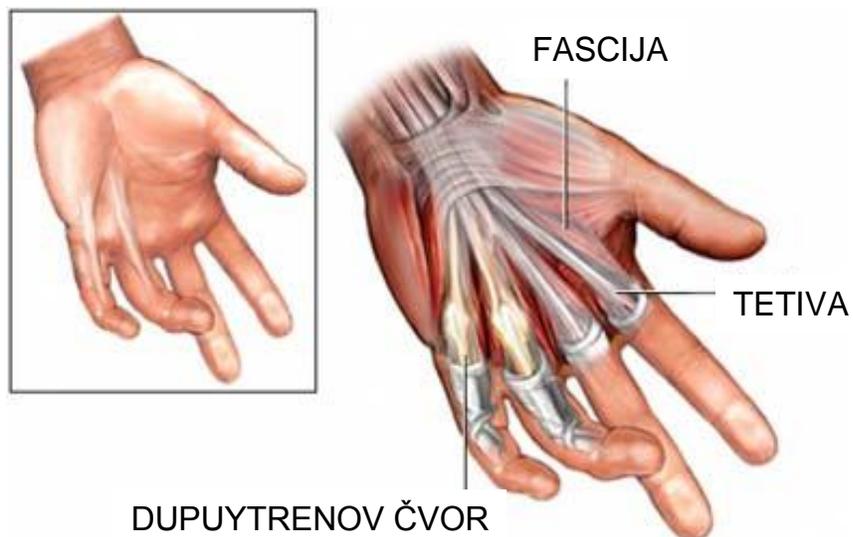
Najčešći razlog nastanka fibroproliferativnih bolesti je oštećenje tkiva uzrokovano kemikalijama, patogenima ili traumom. Posljedica oštećenja tkiva je razvoj upalne reakcije koju posreduju makrofazi, epitelne stanice i stanice imunološkog odgovora koje u zahvaćenom području stvaraju i izlučuju profibrozne citokine i kemokine. Navedene molekule aktiviraju stanice fibroblasta i uzrokuju njihovu diferencijaciju u miofibroblaste te potiču stvaranje i odlaganje izvanstaničnog matriksa. Nepravilna regulacija procesa kasne faze zarašćivanja dovodi do poremećaja apoptoze miofibroblasta i razgradnje izvanstaničnog matriksa pri čemu se razvija kronična ireverzibilna fibroza.



Slika 1. Nastanak i razvoj fibroproliferativnih bolesti

2.2 Dupuytrenova kontraktura

Dupuytrenovu kontrakturu karakterizira razvoj čvoraste palmarne fibromatoze dlana. Benigna fibromatoza se razvija u području palmarne fascije i uzrokuje savijanje prstiju te u konačnici dovodi do trajnog gubitka funkcije dlana. Bolest je opisana još u 9. stoljeću u populaciji Vikinga te se smatra da se njihovom migracijom proširila sjevernom Europom i Britanskim otočjem između 9.-13. stoljeća. Godine 1831. Baron Guillianme Dupuytren prvi je opisao palmarnu fibromatozu dlana te se stoga, njemu u čast, ovaj poremećaj i zove Dupuytrenova kontraktura (Adrian 2001). Iako je Dupuytrenova kontraktura službeno poznata već skoro dva stoljeća, s dobro utvrđenim patološkim promjenama, njezina etiologija još uvijek nije razjašnjena. Razvoj Dupuytrenove kontrakture povezuje se sa nekoliko etioloških čimbenika, a to su trauma, epilepsija, dijabetes, alkoholizam, pušenje i neuropatije (Hueston 1962, Al-Qattan 2006, Augoff i sur. 2005).



Slika 2. Shematski prikaz palmarne fascije

Danas je operativni zahvat standardni način liječenja ali s nezadovoljavajućim rezultatima, zbog pojavnosti velikog postotka recidiva u operiranih pacijenata. DK zahvaća jedan ili više prstiju, najčešće s ultarne strane dlana pri čemu su obično zahvaćeni prstenjak i mali prst, zatim dugi prst, kažiprst i naposljetku palac. Bolest uzrokuje nastanak abnormalnog tkiva, poput ožiljka u dlanu, koje se širi u prste (Bayat i sur. 2006) te dovodi do ireverzibilne, trajne i progresivne kontrakture pri čemu se gubi funkcija šake (Mikkelsen 1977). Prve promijene koje se mogu primijetiti na dlanu bolesnika su promjene na koži, koja postaje zadebljana, gubi svoju fleksibilnost, elastičnost i mobilnost nakon čega dolazi do pojave udubljenja koja su posljedica promjene u strukturi fascije što je rezultat povećanog lučenja kolagena, osobito kolagena III (Hurst i sur. 2000, Bailey i sur. 1977, Bazin i sur. 1980). Razvoj bolesti se često odvija bilateralno (Rayan 2007).

DK se obično javlja kod starije populacije (učestalost 20%), s najvećim postotkom koincidencije kod stanovništva sjeverne Europe, čiji su preci vikinškog podrijetla (preko 30%). Bolest je prisutna u svim dijelovima svijeta s nešto manjim postotkom učestalosti u Japanu, Kini, Africi i Indiji (McFarlane 1985). Postotak oboljele populacije se sa starošću povećava, a vrlo se rijetko javlja kod mlađe populacije. Omjer oboljelih muškaraca u odnosu na žene varira iako je sigurno kako muškarci češće obolijevaju od žena (Anthony i sur. 2007), a omjer opada s povećanjem starosne dobi (Berge i sur. 1988). Primijećeni fenomen se za sada još uvijek ne može razjasniti. Jedan od mogućih objašnjenja može biti taj da veći broj muškaraca ulazi u rizične skupine s obzirom na čimbenike koji pridonose razvoju bolesti dok se s druge strane može raditi o još neutvrđenom mehanizmu nastanka bolesti koji je reguliran ekspresijom androgenih receptora (Pagnotta i sur. 2003). Naime, dokazano je kako je palmarna fascija ciljno tkivo androgenog hormona i da DK ima veću ekspresiju androgenih receptora u usporedbi sa zdravom palmarnom fascijom (Pagnotta i sur. 2002). Nadalje, jedan od mogućih razloga zašto žene rjeđe obolijevaju od DK je činjenica da hormon estrogen ima zaštitničku ulogu koja nestaje u razdoblju menopauze, pa se stoga s povećanjem starosne dobi i kod žena povećava vjerojatnost obolijevanja (Stahl i Calif 2008).

2.3 Faze bolesti Dupuytrenove kontrakture

Razvoj Dupuytrenove bolesti odvija se u tri faze koje su obilježene različitim histološkim osobitostima:

- (1) proliferativna faza,
- (2) involutivna faza,
- (3) rezidualna faza.

Tijekom proliferativne faze, dolazi do stvaranja čvorova fascije dlana (eng. *nodular lesion*) i proliferacije fibroblasta. Pri tome se pojačava dotok krvi i razvoj novih kapilara što je popraćeno proliferacijom endotelnih stanica.

U involutivnoj fazi, proliferirajuće stanice unutar čvorova se počinju mijenjati i razvijati. Stanice fibroblasta s okruglom jezgrom i oskudnom citoplazmom diferenciraju se u miofibroblaste-stanice vretenastog oblika s nazupčanom, izduženom jezgrom i umjerenom količinom citoplazme, koje predstavljaju ključnu komponentu čvorova DK i odgovorne su za kontraktilnu silu (Gabbiani i Majno 1972, Tomasek i sur. 2002). U čvorovima se stanice morfološki mijenjaju u smjeru djelovanja kontrakcija u tkivu, a istovremeno dolazi i do remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Također, broj stanica se počinje smanjivati, a količina izvanstaničnog kolagena u zahvaćenom području fascije se značajno povećava. Vlakna kolagena prodiru u obližnje kožno i potkožno tkivo, a limfociti prodiru u oštećeno područje (Tubiana i sur. 2000).



Slika 3. Faze bolesti: proliferativna, involutivna, rezidualna

Značajke rezidualne faze su nestanak nodula, te pojava relativno acelularnih snopova (engl. *cords*) izgrađenih od gusto pakiranih kolagenskih vlakana. U zahvaćenim dijelovima fascije više nema miofibroblasta, a jedine stanice prisutne u promijenjenom tkivu su fibrociti, s jezgrom vretenastog oblika koji su smješteni između gustih kolagenskih snopova. Fibrocit ili fibroblast u mirovanju manji je od fibroblasta i vretenasta je oblika. U usporedbi s fibroblastom fibrociti imaju manji broj produžetaka, manju tamnu i izduženu jezgru te acidofilnu citoplazmu s malom količinom hrapave endoplazmatske mrežice (Junqueira i Carneiro 2006).

2.4 Etiologija Dupuytrenove kontrakture

Iako je točna etiologija Dupuytrenove kontrakture još uvijek nepoznata, postoje određeni čimbenici rizika koji pogoduju razvoju bolesti te pojavi recidiva.

2.4.1 Genetski čimbenici rizika

Studije provedene na blizancima i unutar obiteljskog stabla, potvrđuju da u etiologiji DK postoji snažna nasljedna komponenta. Naime, pojedinci sa obiteljskom anamnezom imaju veću sklonost za raniji razvoj bolesti sa težim oblikom. Genetska predispozicija dakle postoji, ali se većina autora slaže u tome da geni čine pojedinca sklonijim razvoju DK, a ne da promijenjeni geni direktno uzrokuju bolest (Burge 1999). U istraživanju Hua i sur., dokazana je povezanost regije 6cM na kromosomu broj 16 sa DK ali nije otkriven uzročni gen (Hu i sur. 2005). Kao jedan od mogućih genetskih čimbenika koji bi mogli biti odgovorni za razvoj bolesti je transformirajući čimbenik rasta beta (*engl. transforming growth factor*, TGF- β). Međutim, nije pokazano kako su polimorfizmi u genima TGF- β 1 i TGF- β 2 te TGF- β I-III receptorima povezani sa pojavom DK (Bayat i sur. 2002, 2003). Nadalje, niz autora pokazao je kako bi polimorfizam u genu za transkripcijski faktor ZF9 (*engl. zinc-finger 9*) mogao predisponirati pojedinca za razvoj DK. Čini se kako je ovaj protein direktno odgovoran za povećanu sintezu čimbenika rasta TGF- β 1 i 2 kao i za povećanu sintezu njihovih receptora u serumu i tkivu (Bayat i sur. 2003). Također, utvrđeno je kako neke genske mutacije mogu direktno sudjelovati u patogenezi bolesti. Primjerice, mutacija unutar mitohondrijskog genoma uzrokuje abnormalno visoke razine slobodnih radikala koji potom stimuliraju proliferaciju fibroblasta (Bayat i sur. 2005, Michou i sur. 2011). Osim toga, dokazana je povezanost HLA sustava i autoantitijela na kolagene tipa I-IV kod pacijenata s DK (Pereira i sur. 1986, Neumuller i sur. 1994, Spencer i Walsh 1984). Uz to, dokazana je povećana razina HLA-DR+ T limfocita u tkivu te povećani broj kolagenskih autoantitijela, što dodatno potvrđuje ulogu autokrinih mehanizama u nastanku bolesti (McCarty i sur. 2010).

2.4.2 Okolišni čimbenici rizika

Akutne ozljede šaka, zapešća i podlaktice povezane su sa nastankom DK (Elliot i Ragoowansi 2005). Traume mogu rezultirati malim napuknućima palmarne fascije, kao posljedica pada na ispruženu ruku ili pak jače izraženim akutnim ozljedama. Kod napuknuća palmarne fascije pokreće se proces zacjeljivanja što uključuje aktivaciju citokina interleukina 1 (IL-1) (Larson i sur. 1960). Akutne ozljede pak uključuju tzv. vaskularne mehanizme patogeneze poput ipsilateralnog otoka, vazomotornih smetnji i sekundarnu ishemiju palmarne fascije (Plewes 1956). Poznato je kako pušenje i starenje dovode do mikroangiopatije i ishemije palmarne fascije. Palmarna fascija zahvaćena s DK ima značajno sužene kapilare okružene zadebljalom laminarnom bazalnom membranom (Murell i sur. 1989). Pri tome, pretvorba ATP-a (adenozin trifosfat, engl. *adenosine three phosphate*) u hipoksantin te potom u ksantin i mokraćnu kiselinu, dovodi do otpuštanja slobodnih radikala i direktni je rezultat ishemije u palmarnoj fasciji (Murell i sur. 1989). Oslobođanje slobodnih radikala u stanicama uzrokuje aktivaciju antioksidativnih enzima koji su prirodna zaštita stanica od oksidativnog stresa. No s povećanjem starosne dobi smanjuje se aktivnost antioksidativnih enzima u fibroblastima. Opisani vaskularni i metabolički putovi stoga starenjem mogu barem djelomično uzrokovati DK (Bayat i sur. 2005). Utjecaj alkohola na razvoj DK povezan je s povećanom pretvorbom enzima ksantin dehidrogenaza u enzim ksantin oksidazu te s povećanom razinom nusprodukata metabolizma masti triglicerida i lipofosfatne kiseline (engl. *Lypophosphatidic acid*, LPA) (Rayan i sur. 1996). LPA ima mogućnost vezanja na receptore miofibroblasta što dovodi do smanjenja razine cikličkog adenzin monofosfata (cAMP) i povećanja unutarstanične razine kalcijevih iona Ca^{2+} . Kalcij se veže za kalmodulin i stvara kompleks koji aktivira kinazu lakog lanca miozina. Ovi se procesi povezuju s pojavom kontrakcije kod DK s obzirom da upravo sekundarna aktivacija lakog lanca miozina uzrokuje kontrakciju kompleksa aktin-miozin (Rayan i sur. 1996).

2.4.3 Bolesti

Dupuytrenova kontraktura se povezuje sa nekoliko bolesti uključujući epilepsiju, dijabetes, HIV i karcinom. Kod bolesnika oboljelih od dijabetesa se obično razvije blaži oblik DK, te stoga rijetko zahtijeva kirurško liječenje (Heathcote i sur. 1981, Noble i sur. 1984, Arkkila i sur. 1996, 1997). Promjene u mikrocirkulaciji koje uzrokuju ishemiju u palmarnoj fasciji su najvjerojatniji razlog pojave DK, što ukazuje da je dijabetes samo okidač za nastanak ove bolesti (Lawson i sur. 1983, Hart i Hooper 2005)

Za razliku od njih, bolesnici s epilepsijom razvijaju teži oblik DK, popraćen s nastankom plantarnih čvorova na stopalu (Arafa i sur. 1992). Antikonvulzivna (antiepileptička) terapija je mogući uzrok pojave bolesti jer vjerojatno potiče izlučivanje čimbenika rasta u palmarnoj fasciji (Critchley i sur. 1976). Iako postoji kontradiktornost između objavljenih radova, pacijenti oboljeli od HIV-a također češće obolijevaju od DK (Bower i sur. 1990, French i sur. 1990). Osim toga, utvrđeno je da pacijenti sa DK imaju veću mogućnost obolijevanja od određenih tumorskih bolesti nakon operativnog zahvata. (Wildebrand i sur. 2000, 2002)

2.5 Liječenje

Operativni zahvat još uvijek je osnovna metoda liječenja od Dupuytrenove kontrakture. Kod kirurške obrade se odstranjuju zahvaćeni dijelovi fascije dlana koji se ipak nakon određenog vremena opet pojavljuju. Jedna od mogućnosti liječenja je primjena injekcija steroida u čvorove dlana u svrhu smanjenja boli i odgode progresije, no takve injekcije ne mogu ispraviti deformitete. Steroidi se stoga koriste za usporavanje nastanka čvorova te se primjenjuju i postoperativno jer smanjuju edeme i olakšavaju rehabilitaciju. Eksperimenti su pokazali da steroidi smanjuju proliferaciju stanica i povećavaju stupanj apoptoze fibroblasta u Dupuytrenovom tkivu (Meek i sur. 2002).

Druga mogućnost je kemoterapijsko liječenje u kombinaciji sa operacijom, 5-fluorouracilom (5-FU). 5-FU se do sada koristio za inhibiciju proliferacije

fibroblasta kod zacjeljivanja ožiljka nakon operacije glaukoma. Osim toga, predklinička istraživanja podupiru njegovu aplikaciju u kontroli proliferacije fibroblasta kod zacjeljivanja rana.

Također je istraživani učinak tamoksifena, kao potencijalnog kemoterapeutika u liječenju Dupuytrenove kontrakture. Tamoksifen je sintetički nesteroidni antiestrogen koji se koristi u liječenju tumora dojke. On djeluje na faktore rasta TGF- α , TGF- β , EGF i PDGF. Dokazano je da utječe na transkripciju RNK, smanjuje staničnu proliferaciju, odgađa ili zaustavlja stanice u G1 fazi staničnog ciklusa. Stupanj kontrakcije stanica u uvjetima *in vitro* se nakon obrade tamoksifenom značajno smanjuje u usporedbi sa kontrolnim stanicama. Tamoksifen smanjuje i ekspresiju TGF- β 2 u fibroblastima oboljelih, ali nema učinka na njegovu sintezu u kontrolnim fibroblastima (Ann Huhn i sur. 2002)

Nedavno je u Dupuytrenovom tkivu dokazana ekspresija androgenih receptora i u pripadajućim kulturama stanica. Prisutnost androgenih receptora govori da je metabolizam Dupuytrenovih fibroblasta djelomično reguliran androgenim hormonima. Stoga je istražen učinak 5- α -dihidrotestosterona (DHT) na ekspresiju androgenih receptora, proliferaciju i diferencijaciju fibroblasta dobivenih iz oboljelih od Dupuytrenove kontrakture te fibroblasta iz zdrave palmarne fascije. Utvrđeno je da veća koncentracija 5- α -DHT potiče proliferaciju fibroblasta. Povećanjem koncentracije 5- α -DHT se povećava i količina glatkog mišićnog aktina u fibroblastima uzgojenim iz tkiva oboljelih od Dupuytrenove kontrakture. (Pagnota i sur. 2003)

Molekularne studije na stanicama izoliranim iz tkiva pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture pokazuju da interferon- γ može smanjiti proliferaciju fibroblasta, sintezu kolagena i ekspresiju α -glatkog mišićnog aktina. Nažalost do danas nisu provedene opsežne kliničke studije koje bi potvrdile navedene rezultate dobivene *in vitro*.

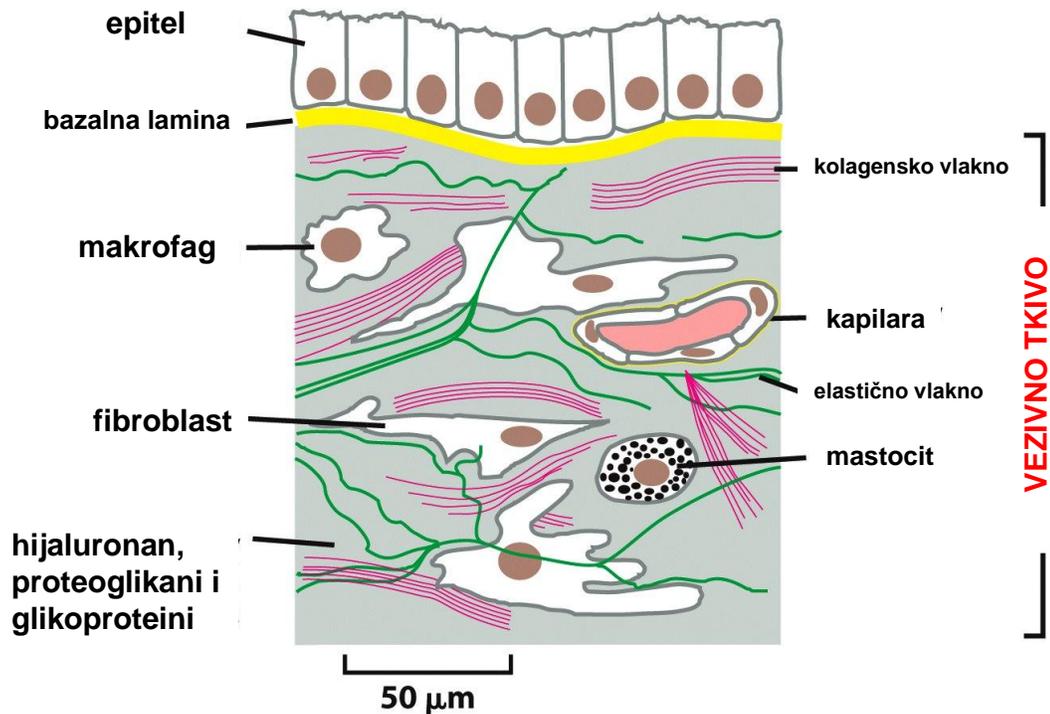
Već nekoliko desetljeća se istražuje mogućnost liječenja Dupuytrenove kontrakture injekcijama kolagenaza. Smjesa kolagenaza koja sadrži proteolitičke i protuupalne enzime se uz pomoć injekcije unosi u čvor nakon čega se fizičkom manipulacijom istezanja prsta cijepaju (prekidaju) snopovi kolagena u čvoru što

uzrokuje smanjenje kontrakture. Sedam različitih kolagenaza dvaju različitih klasa (I i II) je izolirano iz bakterije *Clostridium histolyticum*. Kolgenaze klase I cijepaju mjesta u blizini krajeva kolagena dok kolagenaze klase II cijepaju peptidne veze u središnjem dijelu kolagena. Navedene kolagenaze su matriks metaloproteinaze ovisne o cinku koje specifično cijepaju peptidne veze između glicina i prolina. Trenutno se preparat kolagenaza Xiaflex® nalazi u trećoj fazi kliničkih istraživanja i očekuje se da će biti odobreno njegovo korištenje u liječenju DK. Primjena injekcija kolagenaza u dosadašnjoj eksperimentalnoj terapiji se pokazala relativno uspješna, prije svega u području metakarpofalangealnog zgloba, međutim kod agresivnijih oblika bolesti te u području proksimalnog interfalangealnog zgloba rezultati terapije nisu zadovoljavajući. Primjena ove metode liječenja tijekom dužeg vremenskog perioda, nije u potpunosti sigurna jer može dovesti do oštećenja tetiva, hrskavice kao i oštećenja živaca i krvnih žila. Također u predkliničkim istraživanjima su zabilježene i nuspojave poput lokalne boli, razvoja edema i hematoma, infekcije, krvarenja, imunološke reakcije i dr. Sve navedene mogućnosti liječenja su usmjerene isključivo na posljedice same bolesti a ne na njezin uzrok.

2.6 Vezivno tkivo

Stanice su u tkivima okružene složenim izvanstaničnim matriksom (engl. *extracellular matrix*, ECM) koji često nazivamo i vezivnim tkivom. Za njegovu strukturu i funkciju su važne stanice vezivnog tkiva fibroblasti/miofibroblasti te međustanična tvar. Fibroblasti stvaraju izvanstanični matriks i pomažu u njegovom strukturiranju. Tako primjerice stanični citoskelet može kontrolirati orijentaciju matriksa izvan stanice. Međustaničnu tvar koju proizvode fibroblasti sačinjavaju nitasti proteini koji tvore njegovu trodimenzionalnu strukturu i potporu (kolagen i elastin), specijalizirani glikoproteini za povezivanje stuktura matriksa (fibronekti i laminin) zatim polisaharidni lanci glikozaminoglikani (GAG) vezani na proteine kao proteoglikani te veliki broj enzima uključenih u razgradnju matriksa.

Uloga proteoglikana je da tvore hidratiranu osnovu stvari slične gelu u koju su uloženi fibrozni proteini, povećavajući time otpornost na pritisak, a istovremeno omogućujući brzu difuziju nutrijenata, metabolita i hormona između krvi i stanica.



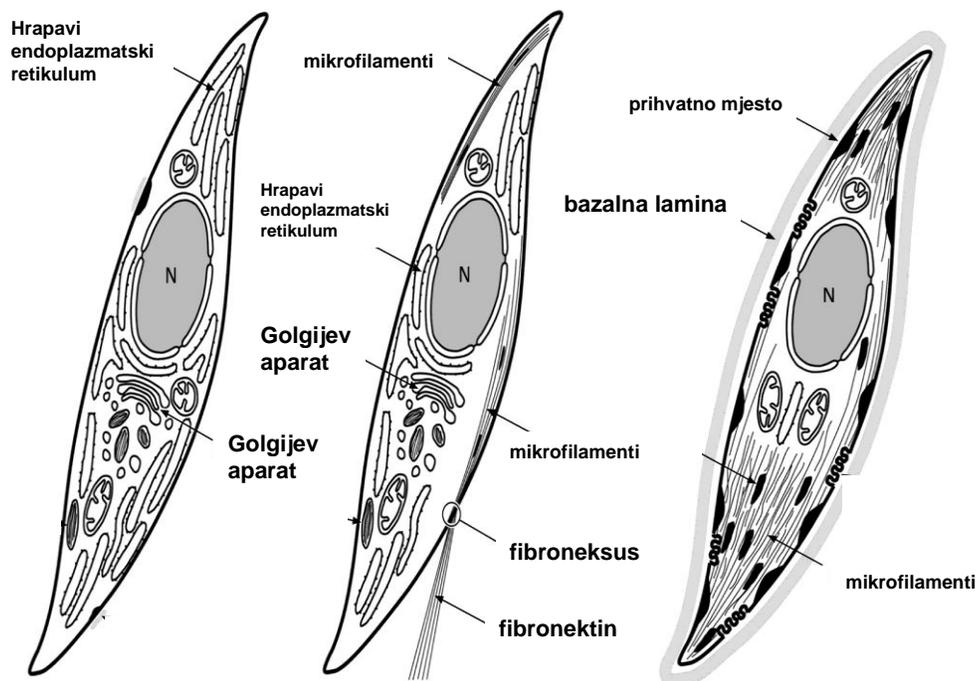
Slika 4. Građa vezivnog tkiva

Izvanstanični matriks regulira (kontrolira) stanično ponašanje i utječe na proliferaciju, preživljavanje, oblik, migraciju i diferencijaciju. Iako se smatralo kako je matriks statička struktura ona se neprekidno mijenja procesima razgradnje i ponovne izgradnje, osobito tijekom normalnog razvoja, diferencijacije i zarastanja rane. Poremećaji u (navedenim procesima) homeostazi matriksa mogu pridonijeti razvoju različitih bolesti. Njegova struktura je određena trodimenzionalnom okolinom i staničnom napetošću koja se prenosi putem membranskih proteina integrina (Daley i sur. 2008).

2.7 Morfologija i uloga miofibroblasta u Dupuytrenovoj kontrakturi

Dupuytrenova kontraktura je rezultat proliferacije stanica pri čemu diferencijacijom fibroblasta u miofibroblaste dolazi do stvaranja kontraktilne sile. Poznato je da miofibroblasti sudjeluju u fibroproliferativnim procesima poput zacjeljivanja rana, oporavku i remodeliranju tkiva, fibromatozama, cirozi jetra, bubrežnim i plućnim fibrozama te razvoju i metastaziranju tumora. Unatoč tomu što miofibroblasti mogu imati specifične funkcije u određenom organu ili tkivu, među njima postoji velika sličnost u morfologiji, funkciji i biokemijskom sastavu neovisno o lokaciji unutar organizma. Međutim, pojedina tkiva mogu sadržavati heterogenu populaciju stanica miofibroblasta koja se zasniva na međusobno različitim fenotipovima i funkcijama. Isti imaju važnu ulogu u zatvaranju rana uz pomoć kontraktilne sile koja nastaje unutar citoskeletnih proteina, stvaranju izvanstaničnog matriksa, njegovom remodeliranju, izlučivanju citokina, kemokina i faktora rasta. (Powell i sur. 1999)

Miofibroblasti igraju ključnu ulogu u Dupuytrenovoj bolesti jer su odgovorni za stvaranje sile stezanja što uzrokuje tipičan simptom ove bolesti odnosno skraćanje tkiva i trajnu kontrakturu. Miofibroblasti sjedinjuju morfološke osobitosti fibroblasta i glatkih mišićnih stanica. Fibroblasti su u odraslom vezivnom tkivu izdužene stanice sa vitkom, glatkom i dobro definiranom jezgrom. U njihovoj su citoplazmi razasuti mitohondriji, a sekretorne organele su dobro razvijene, što uključuje veliki Golgijev aparat i obilni hrapavi endoplazmatski retikulum. Aktinski mikrofilamenti su u fibroblastima smješteni ispod plazmine membrane. Fibroblasti nemaju bazalnu laminu, kao ni specijalizirana mjesta za pričvršćivanje tj. vezanje. Glatke mišićne stanice, za razliku od fibroblasta, obavijene su bazalnom laminom koja sadrži veliki broj prihvatnih mjesta. Uz to, aktinske niti glatkih mišićnih stanica povezane su u snopove orijentirane paralelno duž stanične osi. Jezgra je izdužena i izobličena plitkim udubljenjima, a Golgijev aparat i hrapavi endoplazmatski retikulum su slabo razvijeni.



Slika 5. Morfologija fibroblasta, miofibroblasta i glatke mišićne stanice

Miofibroblasti se razlikuju od fibroblasta i glatkih mišićnih stanica nizom morfoloških osobitosti. Glavna razlikovna osobitost između miofibroblasta i fibroblasta su snopovi aktinskih mikrofilamenata koji su kod miofibroblasta prisutni i orijentirani paralelno duž osi stanice. Ti su filamenti u promjeru i po brojnosti manji od onih koji se nalaze u glatkim mišićnim stanicama. Nadalje miofibroblasti imaju dobro razvijen Golgijev aparat i endoplazmatski retikulum, ali nemaju bazalnu laminu. Slično kao kod glatkih mišićnih stanica, izdužene jezgre miofibroblasta su često deformirane i imaju plitka udubljenja koja ukazuju na kontrakciju stanica. Miofibroblasti imaju specifična mjesta za pričvršćivanje na površini stanice, ali izgleda da se ta mjesta razlikuju od onih u mišićnim stanicama. Čini se da su snopovi unutar staničnih mikrofilamenata miofibroblasta kontinuirano povezani sa izvanstaničnim vlaknima fibronektina na staničnoj membrani. Ova posebna mjesta za pričvršćivanje u miofibroblasta se nazivaju fibroneksus, a nalaze se na površini miofibroblasta u tkivu oboljelih od Dupuytrenove kontrakture (Rayan 1999).

Miofibroblasti imaju unutarstanične snopove mikrofilamenata koji su izgrađeni od vlakana aktina, miozina i pridruženih proteina (npr. vimentina i dezmina). Za aktin kodira grupa gena koja se prepisuje u šest različitih izoformi, a koje se klasificiraju u nekoliko grupa: dva mišićna aktina u poprečno-prugastom mišiću (skeletni aktin α i srčani aktin α), dva mišićna aktina u glatkom mišiću (glatki mišićni aktin α i glatki mišićni aktin γ), te dva mišićna aktina prisutna u svakoj stanici (β -aktin i γ -aktin). U fibroblastima se nalaze samo β -aktin i γ -aktin, a u miofibroblastima se uz njih javlja i glatki mišićni aktin α (engl. *α -smooth actin*). Glatki mišićni aktin α je normalno prisutan u glatkom mišićju odraslog čovjeka, a privremeno se pojavljuje i tijekom razvoja srčanog i skeletnog mišića (Rayan 1999).

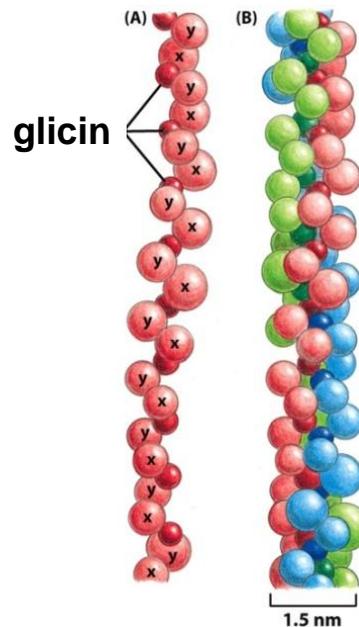
Ekspresija glatkog mišićnog aktina u miofibroblastima je prolazna i javlja se u proliferativnoj i involutivnoj fazi DK, a nestaje u rezidualnoj fazi. Njegovu ekspresiju direktno reguliraju čimbenici rasta kao što su TGF- β i specifični protein ECM fibronektin (Tomasek i sur. 2005). Kontraktilna sila tipična za DK nastaje upravo međudjelovanjem aktina i miozina. Većina miofibroblasta uz aktin i miozin, sadrži vimentin i dezmin. Na osnovu ekspresije citoskeletnih proteina, razlikujemo dva citoskeletna fenotipa miofibroblasta: (1) VA- miofibroblasti pozitivni na vimentin, glatki mišićni aktin i (2) VAD- miofibroblasti pozitivni za vimentin, glatki mišićni aktin i dezmin. Kod DK prisutna su oba navedena fenotipa, ali prevladava, tip VA dok se tip VAD ne može utvrditi u svim nodulima (Rayan 1999).

2.8 Komponente izvanstaničnog matriksa

2.8.1 Kolagen

Protein kolagen ima strukturu trostruke zavojnice koji sačinjavaju tri peptidna lanca (α -lanca). Nalazi se u koži, kostima, tetivama, hrskavici i zubima. Trostruku zavojnicu stabiliziraju vodikove veze preko hidroksilnih grupa hidroksiprolina. Postoji više vrsta kolagena koji se označavaju rimskim brojevima, a razlikuju se u aminokiselinskom slijedu, duljini alfa-lanca ili prisutnosti odnosno

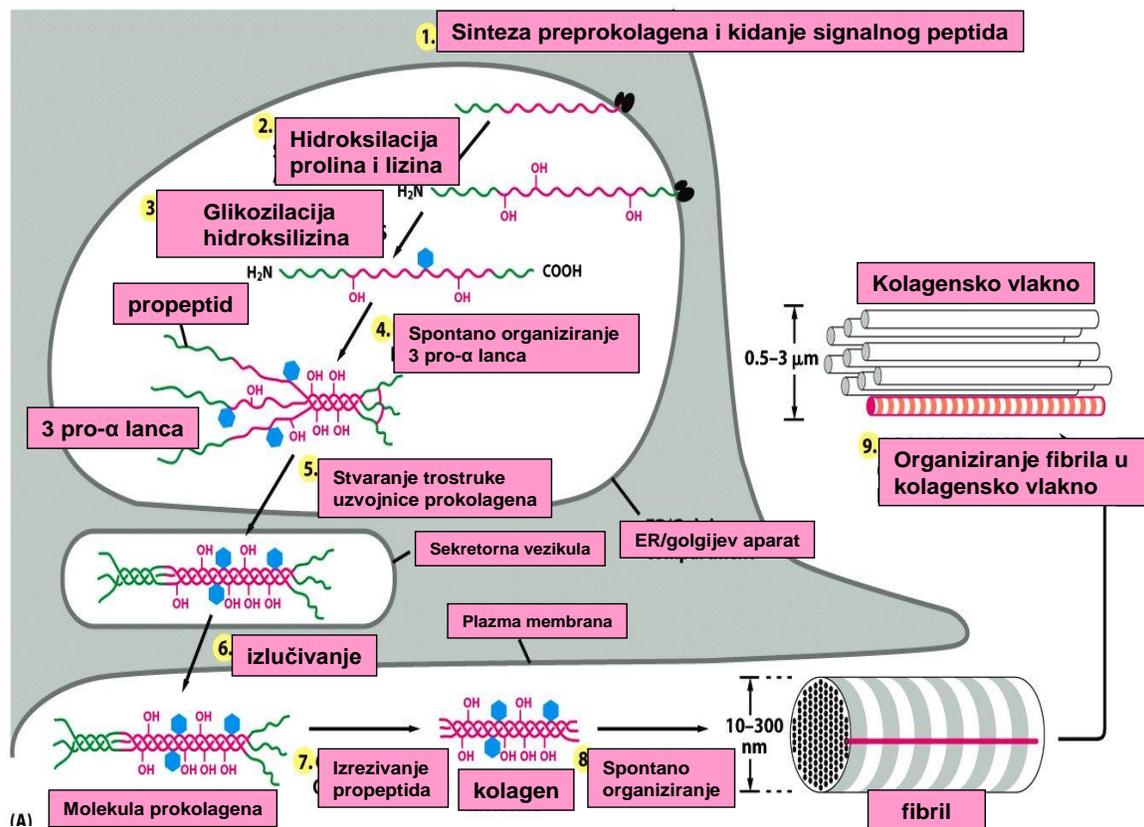
odsutnosti globularnih domena. Kolagen I je najučestalija vrsta kolagena. Sastoji se od dva identična lanca α_1 i jednog lanca α_2 te predstavlja najzastupljeniji strukturni tip kolagena u koži, tetivama i kostima. Zglobna hrskavica sadrži kolagen II kojeg čine tri identična α lanca sa relativno velikom količinom hidroksilizina i karbohidrata. Kolagen III se obično eksprimira istovremeno uz kolagen I, s izuzetkom koštanog tkiva gdje njegova ekspresija nije ustanovljena. Kolagen III nalazi se u tkivima crijeva, velikih krvnih žila te stjenci maternice. Razlikuje se od kolagena I i II po tome što stvara pro-kolagenski produženi peptid sa disulfidnim vezama u izvanstaničnim prostorima (Tubiana i sur. 2000).



Slika 6. Struktura trostruke zavojnice kolagena

U biosintezi kolagena sudjeluje približno 30 gena. Procesuiranje fibrilarnog kolagena je složeno i podijeljeno je na unutarstanično (nastanak prokolagene molekule trostruke uzvojnice) i izvanstanično (cijepanje prokolagena u kolagen i formiranje fibrila). Pojedinačni kolageni (polipeptidni lanci) sintetiziraju se na hrapavom endoplazmatskom retikulumu kao veći prekursori tzv. preprokolagen s vodećom sekvencom koja se uklanja po ulasku u ER. Za stvaranje trostruke strukture uzvojnice su bitne hidroksilne skupine na aminokiselinama lizin i

prolinu te N i C terminalni kraj prokolagena izgrađen od specifičnog peptidnog slijeda tzv. polipeptid za produljenje lanca (engl. *extension peptide*) koji tvori disulfidne veze unutar (N-kraj) i između lanaca (N i C-kraj). Nakon izlučivanja prokolagena izvan stanice, dolazi do enzimske razgradnje propeptida i stvaranja kolagenskih molekula koje se spontano organiziraju u fibrile. U fibrilama nastaju unutar i međulančane kovalentne veze.



Slika 7. Unutarstanični i izvanstanični događaji u stvaranju kolagenskog vlakna

Jedna od glavnih osobina DK je prekomjerno nakupljanje i proliferacija kolagena u čvorovima palmarne fascije. Osim toga, dolazi i do promjene u tipu kolagena. Osnovni kolagen u zdravoj palmarnoj fasciji je kolagen I, premda zdrava fascija može ispoljavati i manje količine kolagena III. U oboljeloj fasciji ovaj odnos se izokreće u korist kolagena III. Nakon brze sinteze nezrelog kolagena III normalne duljine, dolazi do skraćivanja kolagenske strukture tkiva

zbog djelovanja kontraktilne sile miofibroblasta. Proces koji se pokreću u oboljelim stanicama za posljedicu imaju stalno povećanje kontraktilne sile zbog koje se savijaju prsti te gubi funkcija šake. Pri tom se zdrave stanice kontinuirano zamjenjuju promijenjenim stanicama. Proces se sastoji u nastajanju tkivne strukture čiji su osnovni sastavni elementi kolagenske molekule, vlakna i vlakanca normalne duljine i organizacije koja se proteinskim modifikacijama mijenjaju u slične strukture kao kod kolagena tijekom aktivne faze popravka vezivnog tkiva. Izvanstanični matriks pak čine miofibroblasti, fibronektin, laminin i kolageni IV i VI. Kolagen IV i VI, laminin i fibronektin nalaze se samo u područjima s miofibroblastima, te ih stoga nema u rezidualnoj fazi bolesti (Tubiana i sur. 2000).

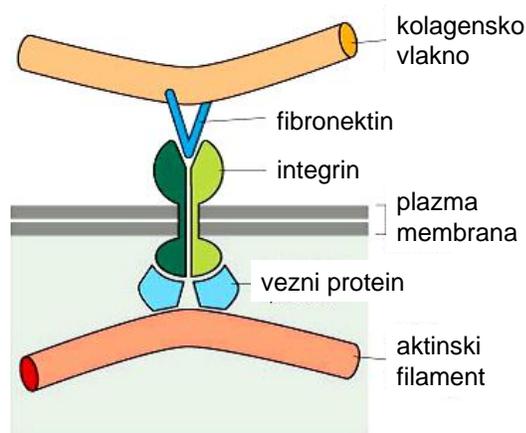
2.8.2 Glikoproteini

U skupinu glikoproteina se ubrajaju: laminini, entaktin, fibronektin, tenascin, periostin, spark/BM40, trombospondin, fibulin. Izvanstanični glikoprotein fibronektin igra važnu ulogu u staničnim procesima kao što su primjerice kretanje, diferencijacija i prijanjanje; svi su ovi procesi izuzetno značajni tijekom razvoja DK. Fibronektini su glikoproteini sa velikim brojem izoformi koje nastaju različitim procesiranjem jednog jedinog genskog transkripta. Promjene pri procesiranju uključuju domene A i B (ED-A i ED-B fibronektin) ljudskog fibronektina i domenu IIIICS, ukoliko je ona prisutna. Posttranslacijska modifikacija glikozilacija na C-terminalnoj regiji fibronektina, odgovorna je za sazrijevanje onkofetalnog fibronektina, prisutnog kako u fetalnom tako i u tumorskom tkivu.

U Dupuytrenovoj bolesti, izoforma fibronektina ED-A pojavljuje se za vrijeme proliferativne faze, a njena se količina smanjuje u rezidualnoj fazi. Izoforma ED-B i *de novo* glikozilirani fibronektin zastupljeni su tijekom proliferativne faze bolesti. Funkcija ovih izoformi još uvijek nije potpuno jasna, ali njihova prisutnost u oboljelom tkivu DK se poklapa sa njihovom prisutnošću u tkivima koja proliferiraju i doživljavaju preobrazbe.

U nizu pokusa *in vivo* pokazano je kako TGF- β 1 u Dupuytrenovom tkivu dovodi do ekspresije fibronektina i onkofetalnih izoformi. Fibronektin se pojačano izlučuje u nodulima oboljelih od Dupuytrenove kontrakture, gdje se skuplja na površini miofibroblasta i sudjeluje u stvaranju fibroneksusa. Na površini miofibroblasta nalazi se integrin-transmembranski glikoprotein α 5 β 1 koji je također dio fibroneksusa, a proteže se kroz staničnu membranu.

Fibroneksus je građevni element, putem kojeg se sila stezanja (kontraktilna sila) uzrokovana aktinskim mikrofilamentima, prenosi u obližnji izvanstanični matriks i tkivo. Također, pretpostavlja se da su fibroneksusi dio signalnih putova stanice. Naime, u njima je utvrđena ekspresija tirozin-kinaza koje sudjeluju u regulaciji proliferacije stanica, njihovoj diferencijaciji kao i u stvaranju izvanstaničnog matriksa. Svi su ti procesi značajni za nastanak i funkciju miofibroblasta kod Dupuytrenove kontrakture (Rayan 1999, Hinz i Gabbiani 2003, Hinz 2006).



Slika 8. Organizacija fibronektina i integrin-transmembranskih glikoproteina koji se protežu kroz staničnu membranu. Fibronektin i integrin sudjeluju u stvaranju fibroneksusa u čvorovima oboljelih od Dupuytrenove kontrakture

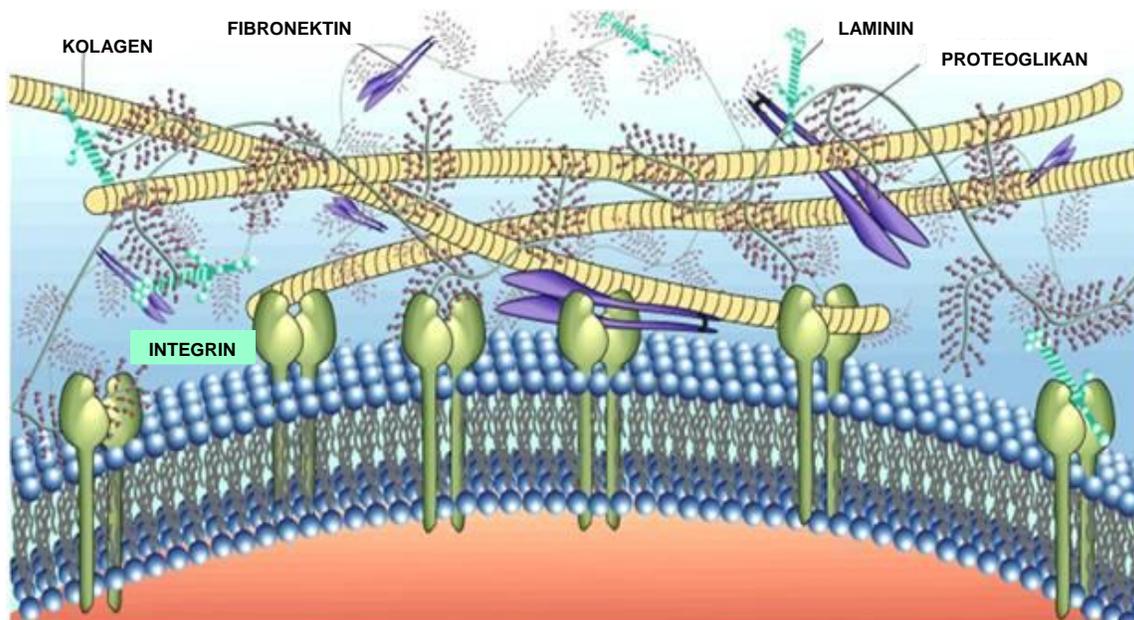
Periostin je ekstracelularni protein zadužen za usklađivanje interakcija između kolagena i staničnih receptora tijekom stanične diferencijacije. Dokazana je povećana ekspresija periostin gena u oboljelom tkivu palmarne fascije u odnosu na kontrolno tkivo iz istog pacijenta (Shih i sur. 2009). Nadalje, u *in vitro*

uvjetima, periostin je uzrokovao stvaranje α -SMA u stanicama miofibroblasta izoliranih iz oboljelog tkiva te značajno povećanje njihove kontrakcije kao i smanjenje apoptoze. Za razliku od njih, periostin je kod stanica iz neoboljelog dijela palmarne fascije potaknuo povećanu proliferaciju i apoptozu (Vi i sur. 2009).

Ostali glikoproteini koji su povećano eksprimirani u DK su trombospondin i fibulin (Ratkaj i sur. 2012, Satish i sur. 2008). Trombospondin inače sudjeluje na različite načine u interakciji između stanice i izvanstaničnog matriksa, posebno se to odnosi na aktivaciju latentnog TGF- β i interakciju s PDGF-om koji imaju važnu ulogu u razvoju Dupuytrenove bolesti (Spinale 2004).

2.8.3 Proteoglikani

Proteoglikani se dijele na glikozaminoglikane, hijaluronsku kiselinu, heparan sulfat i hondroitin sulfat. Biokemijske promjene u oboljeloj palmarnoj fasciji uključuju povećani sadržaj heksozamina i prisutnost galaktozamina. Heksozamin može biti glukozamin ili galaktozamin, a izgrađuje disaharidne jedinice koje se udružuju u ravne polisaharidne lance-glikozaminoglikane. Ravni glikozaminoglikanski lanci su kovalentno vezani za središnji bjelančevinski lanac, s kojim tvore molekulu proteoglikana. Također je utvrđeno značajno povećanje hidroksilizina, ukupnog broja reduciranih poprečnih veza kao i pojava hidroksilizino-hidroksinorlucina koji nije pronađen u zdravoj palmarnoj fasciji. Nezahvaćena fascija oboljelih pokazuje jednake biokemijske promjene ali u mnogo manjem opsegu. Također je dokazana i povećana prisutnost hondroitin sulfata u dijelovima oboljelog tkiva gdje se aktivno odvija proliferacija stanica (Flint i sur. 1982, Tunn i sur. 1988).



Slika 9. Shematski prikaz proteina kolagena, fibronektina, laminina i proteoglikana u izvanstaničnom matriksu

2.8.4 Matriks metaloproteinaze i inhibitori

Matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*, MMPs) pripadaju velikoj skupini (obitelji) od 23 enzima. Određeni proteini unutar ove skupine su jedini enzimi u čovjekovom organizmu, sposobni razgraditi trostruke kolagenske zavojnice u fiziološkim uvjetima. (Brinckerhoff i Matrisian 2002). Klasične kolagenaze su MMP-1, -8 i -13. MMP-2 (gelatinaza A) i MMP-14 (MT1-MMP) također posjeduju specifičnu sposobnost cijepanja ali sa manjom katalitičkom efikasnošću (Knauper i sur. 1996, Ohuchi i sur. 1997). Skupina srodna metaloproteinazama, nazvana dizintegrin i domena metaloproteinaza sa trombospondinskim motivom (ADAMTS) ima 19 članova. Navedena skupina je uključena u restrukturiranje izvanstaničnog matriksa, a sadržava prokolagen N-propeptidaze (ADAMTS-2, -3, -14) te enzime za razgradnju proteoglikana agrekana. U obitelj specifičnih inhibitora matriks metaloproteinaza se ubrajaju 4 tkivna inhibitora matriks metaloproteinaza (engl. *Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*, TIMPs) (Baker i sur. 2002). Svaki od njih može inhibirati većinu matriks metaloproteinaza, ali postoje i neke iznimke pa tako primjerice

TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 ali ne i TIMP-1 inhibiraju membranske metaloproteinaze, a slično je i sa skupinom ADAMTS (engl. *A disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif*, ADAMTs). Matriks metaloproteinaze, srodne metaloproteinaze te TIMP imaju važnu ulogu u patogenezi mnogih fibroznih oboljenja. Naime, normalna izgradnja/razgradnja izvanstaničnog matriksa je rezultat ravnoteže između aktivnosti proteinaza i njihovih inhibitora. Ukoliko je ta ravnoteža poremećena smanjenjem razgradnje i povećanjem izgradnje izvanstaničnog matriksa dolazi do stvaranja fibroze (Brinckerhoff i Matrisian 2002). Tijekom osamdesetih i devedesetih godina prošlog stoljeća korištene su male molekule, inhibitori MMP-aza, u kliničkim istraživanjima različitih vrsta tumora. Glavni neželjeni učinak ovih spojeva je bio razvoj mišićno-koštanog sindroma sa kliničkom slikom vrlo sličnoj Dupuytrenovoj kontrakturi. Ulrich i sur. su u serumu pacijenata oboljelih od DK utvrdili povećanu količinu proteina TIMP-1 u odnosu na pacijente sa karpalnim tunelom, te zaključili da postoji sistemska promjena u omjeru MMP:TIMP koja vjerojatno dovodi do povećanog odlaganja (nakupljanja) kolagena (Ulrich i sur. 2009). Usporedbom cjelokupnog ekspresijskog profila matriks metaloproteinaza između oboljelog tkiva i nezahvaćenog dijela palmarne fascije je rezultiralo identifikacijom niza enzima i inhibitora čija je količina povećana odnosno snižena u oboljelom tkivu. Utvrđena je povećana količina MMP-1, MMP-7, MMP-13, MMP-14, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-9, ADAMTS-14 i TIMP-1, a smanjena MMP-3, ADAMTS-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. (Johnston i sur. 2007). Isti autori su u drugoj studiji dokazali korelaciju između ekspresije (već spomenutih) kolagenaza i kliničkog ishoda bolesti tj. njene pojavnosti unutar jedne godine nakon operacije (Johnston i sur. 2008).

U najnovijem istraživanju je korištena tehnologija siRNA za utišavanje gena matriks metaloproteinaza u stanicama dobivenih iz oboljelog dijela DK i uzgojenih u kolagenskoj suspenziji. Fibroblastima posredovana kontrakcija kolagena je zakočena utišavanjem gena MMP-14 i MMP-2 (Wilkinson i sur. 2012)

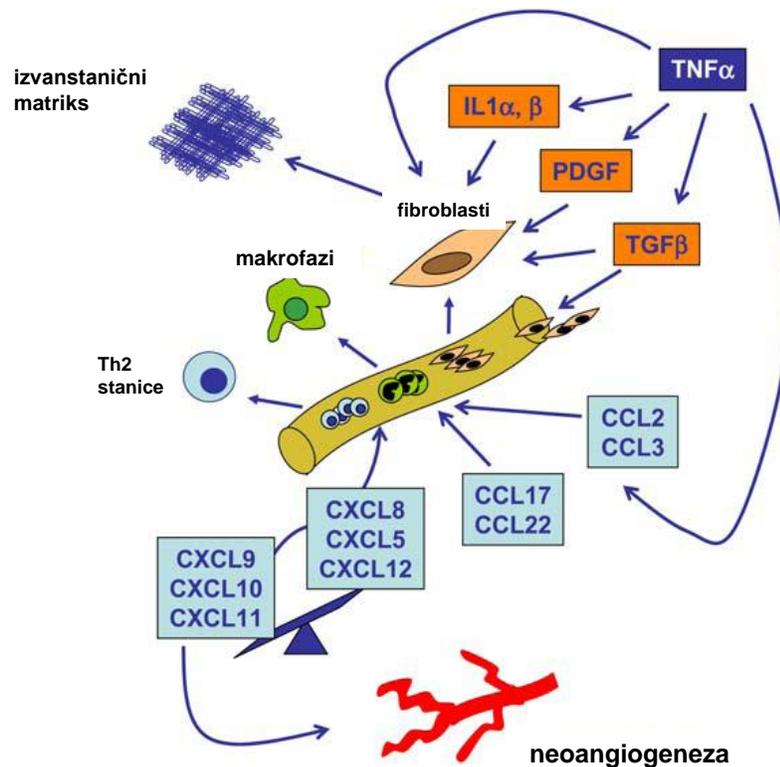
2.9 Dupuytrenova kontraktura i imunološki odgovor (upala)

Fibroza/fibromatoza i upala su dva međusobno zavisna (povezana) stanja sa velikim brojem mehanizama koji se međusobno preklapaju. Tri specifična tipa stanica, makrofazi, pomoćni T-limfociti i miofibroblasti imaju važnu ulogu u reguliranju ovih procesa. Miofibroblasti imaju receptore svojstvene makrofazima i smatraju se sastavnim dijelom prirođenog imunološkog sustava s jasnim funkcijama u imunološkom odgovoru. Zahvaljujući tim karakteristikama, miofibroblasti posjeduju sposobnost aktivnog poticanja upalnog odgovora pojačavajući fibrozne procese (Lupher i Gallatin 2006). Dupuytrenova kontraktura je sigurno jednim dijelom posljedica nekontroliranog (poremećenog, nereguliranog) imunološkog odgovora zbog prodora imunoloških stanica u čvorove tijekom ranog stadija razvoja bolesti gdje izlučuju velike količine različitih citokina, kemokina i čimbenika rasta, osobito TGF- β 1 koji regulira aktivnost fibroblasta. U nekoliko studija je dokazano kako su upalni mehanizmi povezani sa nastankom i/ili razvojem bolesti. Naime u tkivu oboljelih pacijenata je utvrđena prisutnost makrofaga, Langerhansovih stanica, mastocita te limfocita (Andrew i sur. 1991, Qureshi i sur. 2001, Schubert i sur. 2006, Gudmundsson i sur. 1998). Uz pomoć protočne citometrije stanica, dobivenih biopsijom oboljelog tkiva, izmjeren je povećani broj (HLA-DR+) T limfocita u tkivima što ukazuje na mogućnost da je DK autoimuna bolest (Baird i sur. 1993). Također je utvrđena i povišena razina aktiviranih T-limfocita u perifernoj krvi bolesnika s DK (Gudmundsson i sur. 1998). Neumuller i sur. su dokazali povezanost HLA-DR3 i autoantitijela na kolagene I-IV (Neumuller i sur. 1994). Nadalje, udjeli različitih podvrsta monocita i limfocita u perifernoj krvi bolesnika s DK se mijenja ovisno o stadiju bolesti. U proliferativnoj fazi, bolesnici imaju bitno povišen udio monocita, NK-stanica sličnih T-limfocitima, dok je udio B-limfocita značajno snižen. U involutivnoj fazi udjeli monocita i B-limfocita su konstantni, no značajno su sniženi udjeli T-limfocita (Plander i sur. 2008).

2.9.1 Kemokini, citokini i čimbenici rasta

Naziv kemokin je nastao prema njihovoj sposobnosti da uzrokuju kemotaksiju, odnosno kemijski uzrokovanu migraciju drugih stanica. Velika obitelj kemokina broji više od 50 članova koji se mogu podijeliti u četiri grupe na temelju broja i razmaka između dvije susjedne cisteinske jedinice na amino terminalnom kraju: CXC (α -obitelj), CC (β -obitelj), C (γ -obitelj) i CX3C (δ -obitelj) (X je neodređena aminokiselina) (Zimmermann i sur. 2003). Premda su to veličinom male molekule (8-15 kDa), one imaju važnu ulogu u aktivaciji stanica, diferencijaciji i migraciji (regrutaciji) (Nickel i sur.1999). Osim toga, novija istraživanja su otkrila njihovu značajnost u mnogim biološkim procesima, kao što su primjerice angiogeneza, hematopoeza, organogeneza, stanična proliferacija, limfocitna polarizacija, apoptoza, metastaziranje, obrana organizma, zacjeljivanje rana (Gerard i Rollins 2001, Murakami 2004). Prema funkciji, kemokini se mogu podijeliti na inducibilne ili upalne kemokine i konstitutivno eksprimirane ili homeostatske kemokine (Lukacs 2001). Upalni kemokini su značajni za privlačenje različitih vrsta efektorskih leukocita, neutrofila, monocita/makrofaga, dendritičkih stanica i NK stanica u upalno područje i kao takvi imaju ključnu ulogu u prirodnom imunološkom odgovoru. Upalni kemokini se obično mogu vezati na veći broj kemokinskih receptora te putem njih aktivirati čitav niz signalnih puteva unutar stanice. Aktivacija i aktivnost kemokina je usko povezana sa citokinima i faktorima rasta (Agostini i Gurrieri 2006). Kemokini se izlučuju izvan stanice te se preko karboksi-terminalne regije vežu za proteoglikane (glikozaminoglikane) na površini stanice ili u izvanstaničnom matriksu kako bi bili dostupni svojim receptorima. Inače kemokinski receptori se ubrajaju u skupinu G receptora-proteina sa sedam trans-membranskih uzvojnica. Do danas je otkriveno 10 kemokina CC (CCR1-10), sedam kemokina CXC (CXCR1-6), jedan kemokin CX3C (CX3C kemokin receptor (CX₃CR)1) i jedan kemokin C (XCR1). Kemokini također komuniciraju sa strukturnim stanicama poput onih epitelnih, endotelnih, fibroblasta i alfa glatkim mišićnim stanicama. Smatra se kako ove stanice imaju ključnu ulogu u regulaciji migracije (regrutaciji) leukocita u organe i tkiva.

Dokazano je da strukturne stanice ispoljavaju veliki broj kemokinskih receptora ali i kemokina koji imaju autoregulatornu i parakrinu ulogu. Biološka uloga kemokina i kemokinskih receptora na stanice se očituje u poticanju proliferacije, migracije, ekspresije proupalnih i profibroznih gena (Esche i sur. 2005, Raman i sur. 2011). Iako do sada uloga kemokina nije sustavno istažena kod DK, jedna studija na srodnoj fibromatozi, točnije Peyronievoj bolesti, je utvrdila značajno povećanu ekspresiju kemokina MCP-1/CCL2 nakon inkubacije stanica fibroblasta iz oboljelog tkiva s citokinom TGF- β u odnosu na kontrolne stanice iz bolešću nezahvaćenog tkiva (Szardening-Kirchner 2008).



Slika 10. Shema citokinske/kemokinske mreže i različitih vrsta stanica u patogenezi plućne fibroze

Citokini su molekule koje izlučuju određene stanice kao odgovor na stanje u njihovoj neposrednoj okolini (npr. izloženost patogenu ili ozljedi). Odgovorne su za komunikaciju između stanica i dio su velike kompleksne signalne mreže.

Funkcija citokina je aktivacija matičnih stanica iz koštane srži, regrutacija monocita i makrofaga, aktivacija T i B limfocita, aktivacija proteolitičkih enzima kod koagulacije krvi, fibrinolize, komplementa, kinina. Osim toga, stanice fibroblasta su osjetljive na njihovo djelovanje, a također mogu i same izlučivati veliki broj različitih citokina. Utjecaj pojedinog citokina na stanicu može biti aditivan, inhibicijski ili sinergijski u uzajamnom djelovanju s drugim citokinima, hormonima te antagonistima na citokinske receptore (Atamas 2002, Courtney i sur. 2004).

Citokini su male molekule veličine 100-200 aminokiselina. Nomenklatura citokina bazira se na njihovom staničnom izvoru, pa se prema tome dijele na monokine, koji nastaju od mononuklearnih fagocita te limfokine koji nastaju od limfocita. Citokini koji nastaju izravno od leukocita i djeluju na leukocite nazivaju se interleukini. Citokine u organizmu opisuju svojstva pleiotropnosti; jedan citokin ima mnogostruka mjesta djelovanja i redundancije; više citokina ima jednak učinak. Njihov učinak najčešće je lokalna; parakrini i autokrini, no kad nastaju u velikoj količini prelaze u krvotok i djeluju endokrinno kao hormoni.

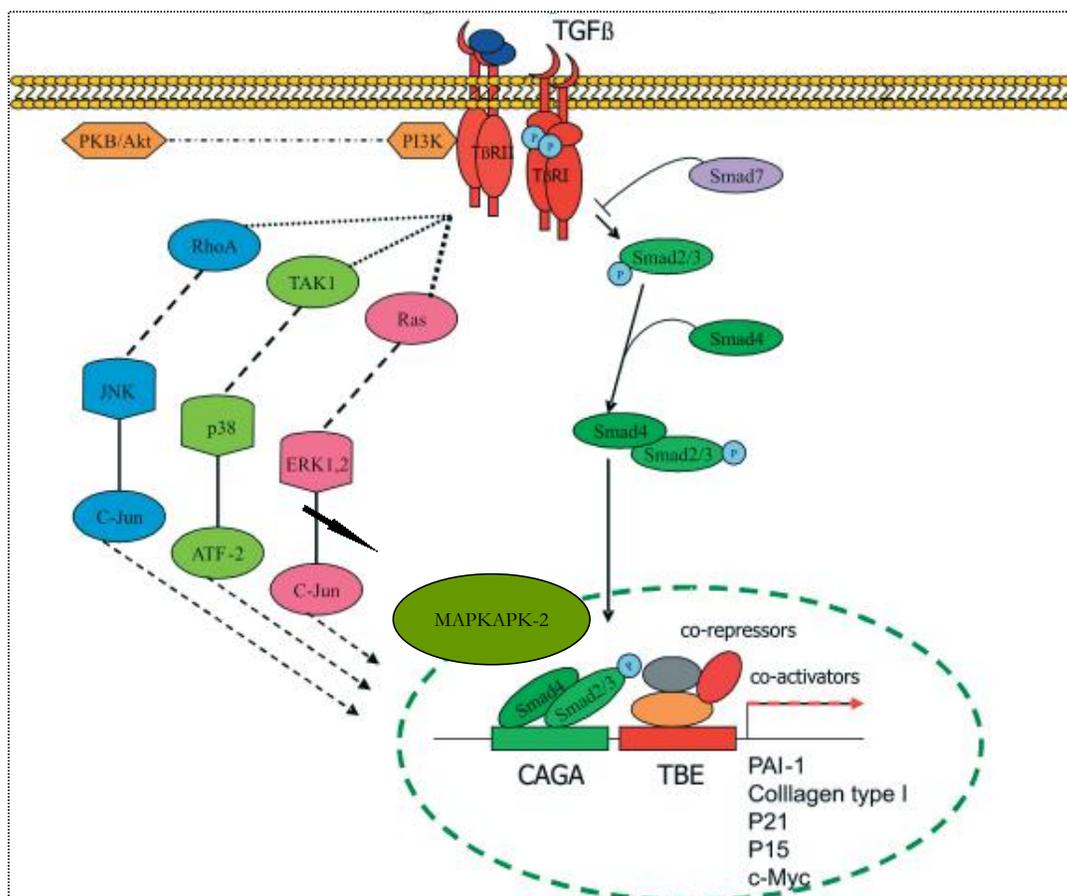
Ovisno o njihovom utjecaju na imunološki odgovor dijele se na proupalne, protuupalne i hematopoetske. Glavni proupalni citokini su IL-1, IL-6 i TNF- α , a njihova uloga je aktivacija imunološkog odgovora na prisutnost patogena. Protuupalni citokini smanjuju funkciju i sintezu tzv. proupalnih citokina, primjerice IL-4 i IL-10. Učinak citokina ostvaruje se njihovim vezanjem na specifične membranske receptore. Ekspresiju citokinskih receptora reguliraju vanjski signali, a time i odgovor stanice na citokine. Odgovor stanice ostvaruje se u obliku promjene ekspresije gena, što rezultira pojavom novih staničnih funkcija, a ponekad i proliferacijom ciljne stanice. Receptori s izvanstanične strane vežu ligand (citokin) što uzrokuje promjenu konformacije i aktivaciju signala s citoplazmatske strane, čime započinje unutarstanični signalni put. Iznimku čine kemokini koji potiču staničnu migraciju i TNF- α koji inducira apoptozu. Postoji nekoliko tipova citokinskih receptora. Tip I i II, superobitelj imunoglobulina (Ig), TNF- α receptori i serpentinski receptori vezani uz G-protein. Koncentracija citokina u plazmi rezultat je upalnog procesa u organizmu, a može biti i

predviđajući čimbenik za autoimune bolesti (primjerice za reumatoidni artritis) ili za procjenu imunomodulatornog učinka hrane i lijekova (Abbas i Lichtman 2005). Baird i suradnici su dokazali da je IL-1 najzastupljeniji citokin u fasciji DK. Vežanje IL-1 na specifični imunoglobulinski receptor potiče proizvodnju čimbenika rasta, stimulaciju Langerhansovih stanica i proliferaciju fibroblasta najvjerojatnije putem transkripcijskih faktora c-fos i c-Jun (Baird i sur. 1993). Također IL-1 potiče makrofage na proizvodnju različitih čimbenika rasta (npr. TGF- β , FGF, PDGF, EGF).

U dosadašnjim istraživanjima posebna pozornost posvećena je čimbenicima rasta. Naime, oni su važni čimbenici uključeni u diferencijaciju, proliferaciju, i gensku regulaciju kod miofibroblasta (Cordova i sur. 2005). U Dupuytrenovom je tkivu utvrđena povećana količina trombocitnog čimbenika rasta, PDGF-a (engl. *platelet-derived growth factor*) (Badalamente i sur. 1992, Terek i sur. 1995), fibroblastnog čimbenika rasta, FGF-a (engl. *fibroblast growth factor*) (Gonzalez i sur. 1992, Berndt i sur. 1995), transformirajućeg čimbenika rasta, TGF- β (engl. *transforming growth factor- β*) (Baird i sur. 1993). Također je dokazana smanjena koncentracija epidermalnog čimbenika rasta, EGF-a (engl. *epidermal growth factor*) u oboljelom tkivu DK. Koncentracija EGF-a se mijenja ovisno o stupnju razvoja bolesti; u usporedbi sa zdravim tkivom, u prvoj fazi koncentracija EGF-a je smanjena, a tijekom druge faze i u ranoj trećoj fazi bolesti koncentracija je povećana, nakon čega se opet smanjuje da bi se u završnoj fazi približila koncentraciji u kontrolnom uzorku (Augoff i sur. 2003). Isto tako istražena je i prisutnost odnosno omjer između membranskog i unutarstaničnog receptora EGF-R tijekom različitih kliničkih faza bolesti (engl. *epidermal growth factor-receptor*) te je utvrđena njegova povećana količina u involutivnoj fazi bolesti u odnosu na zdravu (kontrolnu) palmarnu fasciju. Kraljević Pavelić i sur. su utvrdili povećanu ekspresiju receptora ERBB2 (engl. *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) i IGF-R1 (engl. *Insulin-like Growth Factor 1*) u stanicama izoliranim iz zahvaćene fascije dlana pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture (Kraljević Pavelić i sur. 2011). Kod Dupuytrenove bolesti (TGF- β) ima ključnu ulogu u stvaranju kolagena i fibronektina, poticanju

prolifracije fibroblasta/miofibroblasta i njihove kontrakcije (Bisson i sur. 2003, Badalamante i sur. 1996). TGF- β je homodimerni protein veličine 25kDa, a njegov gen je smješten na kromosomu 19q13. Aktivni oblik citokina TGF- β veže se za receptor TGF- β tipa II pri čemu dolazi do dimerizacije receptora s receptorom TGF- β tipa I i njegove naknadne aktivacije (fosforilacije). Nakon aktivacije kompleksa receptora, kinaza serin/treonin vrši fosforilaciju proteina SMAD2 i SMAD3 koji se potom vežu na protein SMAD4 i translociraju ga u jezgru. U jezgri se proteini SMAD vežu s različitim transkripcijskim faktorima i na taj način moduliraju njihovu aktivnost i ekspresiju gena (Feng i sur. 2005, Shi i sur. 2003). SMAD3 se tako veže na regulatorne regije gena α -SMA: uzvodno od promotorske sekvence i unutar promotorske regije (Hu i sur. 2003, Uemura i sur. 2005). Citokin TGF- β može utjecati na ekspresiju α -SMA i neovisno o aktivnosti proteina SMAD, putem aktivacije fosfatidilinozitol-3 kinaze (Wilkes 2005) ili vezanjem proteina Sp1/2 (Roy i sur. 2001, Tomasek i sur. 2005, Cogan i sur. 2002).

Poznato je kako TGF- β unutar stanice aktivira i čitav niz signalnih serin/treonin mitogen aktivirana protein (MAPK) kinaza uključujući JNK, ERK1/2 i p38 (Kaminska i sur. 2005, Yu i sur. 2002). Kinaze MAPK su tirozin specifične proteinske kinaze koje se mogu aktivirati izvanstaničnim podražajima kao npr. citokinima, faktorima rasta ili stresom. Dokazano je kako inhibicija signalnog puta p38 umanjuje fibrozu pluća i bubrega u animalnim modelima (Matsuoka i sur. 2002, Sugiyama i sur. 2010). Osobito je u tom signalnom putu zanimljiva MAPK - aktivirana protein kinaza-2 (MAPKAPK-2 ili MK2) koja zajedno s kinazom MK3 predstavlja glavnu nizvodnu metu za p38. MK2 ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, reorganizaciji aktina, razvoju stanice, migraciji i proizvodnji citokina/kemokina (Gaestel i sur. 2006). Također je dokazano u pokusima na miševima da MK2 sudjeluje u diferencijaciji fibroblasta u miofibroblaste tijekom razvoja fibroze pluća (Liu i sur. 2007). Studija Thuraisingame i sur., je pokazala kako MK2 također sudjeluje u procesu zacjeljivanja rane kod miševa (Thuraisingam i sur. 2010).



Slika 11. Signalni putovi TGF- β 1

Nedavna studija pokazala je kako je signalni put p38 aktiviran i u stanicama uzgojenim iz bolešću zahvaćenog tkiva oboljelih od DK, dok je inhibicija tog signalnog puta značajno smanjila ekspresiju glavnih markera miofibroblasta glatkog mišićnog aktina α i paladina. Pored toga potvrđena je i uloga TGF- β 1 u nastanku fenotipa miofibroblasta što je u direktnoj korelaciji s nastankom simptoma DK, kao i aktivacija kinaze p38 u normalnim fibroblastima tretiranim s TGF- β 1 (Ratkaj i sur. 2012). Slično su Krause i sur. utvrdili da aktivacija ERK1/2 MAPK uz pomoć TGF- β uzrokuje pojačanu proliferaciju i kontrakciju fibroblasta uzgojenih iz pacijenata oboljelih od DK (Krause i sur. 2011).

2.10 Globalne metode u istraživanju mehanizama nastanka Dupuytrenove kontrakture

Zadnjih godina se u molekularnoj medicini odvijaju značajni proboji kojeg su omogućile globalne studije stanica i tkiva uz pomoć kojih je moguće pratiti stanje i promjene u svim biološkim procesima što se odvijaju u stanici tijekom jednog jedinog eksperimenta. Nedavno su tako publicirane i globalne studije koje djelomično rasvjetljavaju patogenezu DK, a koje su pratile promjene u ekspresiji gena i proteina uključenih u razvoj i nastanak bolesti. Rezultati tih studija pokazuju kako postoje promjene u obrascu ekspresije gena u bolesnim tkivima, a koje su bile konzistentne s prethodno opisanim pojedinačnim procesima povezanim s razvojem DK.

Nekoliko istraživanja DK provedeno je tako uz pomoć mikročip analize pri čemu su dobiveni ekspresijski profili bolesti. Qian i sur. su tako uspoređivali ekspresiju gena između Dupuytrenovih čvorova i nezahvaćene tetive što je rezultiralo identifikacijom 16 gena s povišenom i 3 gena s sniženom ekspresijom u bolešću zahvaćenim tkivima (Qian i sur. 2004). Otkriveni geni sudjeluju u razgradnji kolagena, stvaranju kontraktilne sile, diferencijaciji, odgovoru na oksidativni stres, regulaciji apoptoze, proteolizi, upalnim procesima, nastanku fibroze i okoštavanju. Mnogi opisani stanični procesi, iako mogu objasniti tipične simptome bolesti, već su od ranije poznati i ne donose nove spoznaje u karakterizaciji bolesti. Rehman i suradnici s druge strane, proveli su vrlo temeljitu analizu uspoređujući ekspresije gena u čvorovima i snopovima pacijenata koji boluju od DK s ekspresijom gena u fasciji pacijenata koji boluju od sindroma karpalnog kanala (tzv. nezavisna kontrola) (Rehman i sur. 2008). Također su usporedili i ekspresijske profile čvorova i snopova s ekspresijskim profilima nezahvaćene fascije iz istog pacijenta (tzv. unutarinja kontrola). Analiza rezultata pokazala je kako je u razvoj DK uključeno nekoliko novih signalnih putova koji uključuju proteolizu, deregulaciju rasta stanica, proliferaciju, diferencijaciju, interakcije ECM i receptora i staničnu signalizaciju. Osobito zanimljiv rezultat je onaj koji ekspresijski profil DK povezuje s fibrozom jetra. Radi se o rezultatu koji

je pokazao povećanu ekspresiju gena koji kodiraju za kolagen Va2 (COL5a2), ADAM metalopeptidaznu domenu 12 (engl. *ADAM metalloproteinase domain 12*, ADAM12), protein bogat cisteinom i glicinom 2 (engl. *cysteine and glycine-rich protein 2* CSRP2) te smanjenu ekspresiju pojačivača prokolagen C endopeptidaze 2 (engl. *procollagen C-endopeptidase enhancer 2*, PCOLCE2) i matriks metalopeptidaze 3. U najnovijoj studiji, Ratkaj i suradnici su uz pomoć mikročip tehnologije (Affimetrix, HG-U133A) analizirali razliku u ekspresiji gena između fibroblasta uzgojenih iz oboljelog tkiva pacijenata i nezahvaćene palmarne fascije, što je rezultiralo identifikacijom 12 gena s povišenom i 6 gena sa sniženom ekspresijom u stanicama izoliranim iz oboljele fascije. Potrebno je istaknuti da je utvrđena povećana ekspresija gena p38 signalnog puta, trombospondina 1 (THBS1), GADD45 α i AMP-aktivirajuće protein kinaze (NUAK1) koji su uključeni u staničnu proliferaciju i stvaranje proteina izvanstaničnog matriksa. (Ratkaj i sur. 2012, Kraljević Pavelić i Ratkaj 2012)

Proteomska istraživanja, koja se komplementarno vežu na transkriptomске analize, mogu specifično ukazati na biološke čimbenike patoloških procesa pojedine bolesti na razini proteoma. Iako postoji čitav niz proteomskih metoda, jedan od najčešće korištenih pristupa je dvodimenzionalna (2D) gel elektroforeza u kombinaciji sa spektrofotometrom masa (MS, engl. *mass spectrometry*). Primjerice, metodu 2D-MALDI-TOF MS (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight*) primijenili su Bayat i suradnici za preliminarna proteomska istraživanja zdrave fascije i čvorova i snopova iz bolesne fascije (Bayat i sur. 2006). Opsežnu proteomsku studiju su također proveli Kraljević Pavelić i suradnici na tkivima dobivenim iz bolesne i bolešću nezahvaćene fascije iz istih pacijenata (Kraljevic Pavelic i sur. 2008). Njihovi su rezultati pokazali kako postoje promijene u ekspresiji proteina ECM, citoskeleta, proteina odgovornih za kontrakciju mišića i proizvodnju energije (glikoliza i citratni ciklus), proteina uključenih u regulaciju apoptoze i oksidativnog stresa. Otkrili su također kako je u proliferacijskim signalima fibroblasta kod DK važan i signalni put Akt.

Još jedna proteomska metoda koja je korištena u analizi patogeneze DK je SELDI-TOF MS (engl. *Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). Ova metoda može detektirati potencijalne biomarkere iz velikog broja različitih uzoraka kao što su serum, plazma, urin, stanični lizat, a primjenjuje se i za određivanje protein-protein interakcija, protein-DNK interakcija i poslije-translacijskih modifikacija. Primjenom ove metode O’Gorman i suradnici identificirali su nisko molekulske peptide i/ili proteine (O’Gorman i sur. 2006). Nakon temeljite analize broj diferencijalno eksprimiranih proteina smanjen je na 3 proteina koji su imali povišenu ekspresiju u bolesnom tkivu i koji bi mogli biti potencijalni biomarkeri bolesti.

Tehnologija miRNA je također korištena u istraživanju DK. Uz pomoć ove tehnologije je dokazana povećana ekspresija miR-29c, miR-130b, miR-101, miR-30b i miR-140-3p. Navedene miRNA molekule imaju važnu ulogu u regulaciji gena povezanih sa β -kateninskim putem; WNT5A, ZIC1 i TGF- β 1 (Mosakhani 2010). Inače β -kateninski put je već istraživani u Dupuytrenovoj kontrakturi. Tako je western blot analizom stanica uzgojenih u uvjetima *in vitro* je dokazano da promjena u napetosti kolagenskog matriksa uzrokuje dramatičan porast količine β -katenina (Howard i sur. 2003). To je ključna signalna molekula, čiji je gen često mutiran u ljudskim karcinomima, ali i Dupuytrenovoj bolesti.

Razvidno je kako se implementacijom novih globalnih metoda u klinička istraživanja može osigurati efikasnije otkrivanje specifičnih molekulskih promjena u pojedinim bolestima te tako unaprijediti tradicionalne načina liječenja.

3. Materijali i metode

3.1 Uzorci i ispitanici

Uzorci tkiva prikupljeni su u KBC Dubrava i Rijeka, tijekom regularnih operativnih zahvata oboljelih od DK. Korišteno je ukupno 12 uzoraka tkiva dobivena od pacijenata starosne dobi od 54 do 74 godina s dijagnosticiranim zadnjim involucijskim stadijem bolesti. Za pokuse su korišteni uzorci tkiva dobiveni iz makroskopski nezahvaćenog dijela palmarnog fascijalnog kompleksa. Također, za analizu polimorfizama uzeti su uzorci krvi 44 pacijenata oboljelih od DK i 46 kontrolnih uzoraka krvi. Krv je pohranjena na +4°C u standardnim epruvetama s EDTA (BD Vacutainer® System, SAD).

Svi pacijenti pročitali su obavijest o istraživanju i potpisali informiranu suglasnost za korištenje tkiva i krvi u svrhu provođenja pokusa. Klinički su se uzorci tkiva i krvi prikupili u skladu s pravilima etičke komisije za istraživanje uzoraka ljudskog porijekla koji su na snazi u KBC Dubrava i KBC Rijeka, odnosno poštujući etičke i bioetičke principe: osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost, a sve u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Osigurana je privatnost (medicinska tajna) ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka.

Ispitanici su upoznati s istraživanjem te su svoj pristanak na sudjelovanje u istraživanju potvrdili potpisivanjem informirane suglasnosti koja sadrži jasnu i detaljnu obavijest ispitaniku i njegovu suglasnost koju potvrđuje potpisom.

3.2 Uzgoj stanica *in vitro*

Tijekom operacije Dupuytrenove kontrakture iz svakog pacijenta je odstranjen zahvaćeni dio palmarne fascije (D) kao i pripadajući kontrolni uzorak, djelić nezahvaćene palmarne fascije (ND) koji se koristio za uzgoj primarnih staničnih kultura za svakog pacijenta zasebno. Uzorci tkiva su odmah po ekstirpaciji uronjeni u fiziološki pufer PBS (engl. *phosphate buffered saline*; 1.36 M NaCl, 26 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄ i 14 mM KH₂PO₄, pH 7.4) koji je sadržavao 100 jedinica/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (GIBCO Invitrogen, SAD).

Daljnja obrada tkiva za uspostavu primarne kulture stanica provedena je prema standardnom protokolu za uzgoj stanica (Khalil i sur. 2005). Ukratko, tkivo je usitnjeno na komadiće pomoću skalpela. Komadići tkiva postavljeni su u plastične petrijeve posude (Sarstedt, Njemačka) u koje je dodano 10 mL hranjive podloge DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO Invitrogen, SAD) uz dodatak 10%-tnog seruma telećeg fetusa (FBS, eng. *Foetal bovine serum*, GIBCO, Invitrogen, SAD). Petrijeve posude ostavljene su u inkubatoru u vlažnoj atmosferi pri 5% CO₂ na 37°C. Nakon 10-15 dana stanice su se počele dijeliti i širiti oko komadića tkiva koji su potom uklonjeni. Stanice su rasle još 10 dana nakon čega su presađene uz pomoć 0.25%-tne otopine TrypLE Expressa (GIBCO Invitrogen, SAD). Nakon postizanja 70-90% konfluentnosti stanične kulture jedan dio stanica zamrznut je, a drugi dio je presađen u nove plastične boce za uzgoj staničnih kultura (Sarstedt, Njemačka).

3.3 Model primarnih stanica *in vitro*

Za istraživanje uloge citokina TGF-β1 i kinaze p38 u uvjetima *in vitro* na rast i molekularna svojstva primarnih staničnih kultura fibroblasta, korišten je komercijalno dostupan Transformirajući čimbenik rasta-beta1 (TGF-β1, R&D Systems, SAD) i inhibitor fosforilacije kinaze p38 (SB203580, Calbiochem, VB). TGF-β1 je otopljen u 100 µl radne otopine (4mM HCl i 1% albumina goveđeg seruma) kako bi se dobila otopina koncentracije 10 µg/ml. Inhibitor kinaze p38 je otopljen u DMSO-u u koncentraciji 5 mg/ml. Za sve pokuse su korištene stanične kulture uzgojene iz tkiva fascije koje nisu bile zahvaćene bolešću (stanice ND). Korištene su stanice iz 2. pasaže. Iz ukupno 6 tkiva, primarne su stanice istovremeno presađene u 6 zasebnih boca za uzgoj stanica (Sarstedt, Njemačka) i podijeljene u tri grupe:

- Kontrolne stanice uzgojene iz tkiva koji nisu zahvaćeni bolešću (stanice ND);

- Stanice ND tretirane s pro-fibrogeničnim citokinom TGF- β 1 u koncentraciji 3 ng/ml u mediju bez seruma tijekom 16 sati kako bi se potaknula diferencijacija stanica;
- Stanice ND inkubirane s inhibitorom aktivacije kinaze p38 SB203580 u koncentraciji 10 μ M pola sata prije i za vrijeme stimulacije stanica s TGF- β 1 u trajanju 16 sati u mediju bez seruma.

Sve stanice su prije tretiranja isprane tri puta s medijem bez seruma i ostavljene u inkubatoru 1 sat u mediju bez seruma.

3.4 Western blotting

3.4.1 Izolacija ukupnih staničnih proteina

Nakon tretmana stanica s TGF- β sa ili bez inhibitora p38, isprane su na ledu dva puta s PBS-om. Izolacija proteina provela se s puferom RIPA (50 mM Tris HCl, pH=8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% natrij deoksikolat, 0,1% SDS) uz dodatak koktela inhibitora proteaza (Roche, Švicarska) i koktela inhibitora fosfataza (Thermo Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon 10 minuta stanice su sastrugane s podloge, prelijete u epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka) i centrifugirane 15 min na 15000 g. Supernatant sa ukupnim staničnim proteinskim lizatim pohranjen je na -80°C za daljnje analize.

3.4.2 Kvantifikacija proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određena je uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta za kvantifikaciju proteina (DC Protein Assay Kit, BIO-RAD, SAD) koji se temelji na reakciji proteina s lužnatom otopinom bakrenog tartarata koji potom reducira Folinov reagens (Lowry i sur. 1951). Kao standard je korišten albumin goveđeg seruma (Sigma, Njemačka) u pet različitih koncentracija (0.2, 0.6, 0.8, 1.2, 1.5 mg/mL) te razrjeđenje uzorka 1:1. Za očitavanje koncentracije na mikrotitarskim pločicama, u jažice je dodano 5 μ L standarda i uzorka u triplikatu, 25 μ L reagensa A' i 200 μ L reagensa B prema uputi proizvođača. Potom su

pločice inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je očitana absorbancija na 750 nm. Na temelju očitanih vrijednosti absorbancija standarda, konstruirana je baždarna krivulja ovisnosti absorbancije o koncentraciji iz koje se ekstrapolacijom na X-osi izračunala koncentracija proteina u uzorku.

3.4.3 SDS-poliakrilamidna-gel elektroforeza

Za SDS-poliakrilamidnu-gel elektroforezu korišteni su sustavi za okomitu gel-elektroforezu Mini-Protean (BIO-RAD, SAD) te poliakrilamidni gelovi gustoće 9% spravljeni prema recepturi proizvođača za denaturirajuće uvijete. Uzorci su nanoseni na 4%-tni gel (tzv. "stacking" gel) u koji se odmah po izlivanju umetnu češljici sa zupcima debljine 1.5 mm. Po završenoj polimerizaciji, sustav se prenio u kadicu s puferom za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3), te su se u jažice na gelu nanijeli uzorci koji su sadržavali ukupno 40 µg proteina. Uzorci su se prije nanošenja na gel razrijedili i denaturirali u puferu za nanošenje uzoraka (Laemmli Sample Buffer, BIO-RAD, SAD) koji sadrži deterdžent natrijev dodecil-sulfat, SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*), koji kida sve nekovalentne interakcije u nativnim proteinima. Redukcija disulfidnih mostova je postignuta dodatkom β-merkaptoetanolom (95% Laemmli Sample Buffer i 5% β-merkaptoetanolom). Uzorci su potom grijani na 95°C 5 minuta. Kao biljeg molekulske mase korišteni su standardi Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD, SAD). Nakon elektroforetskog razdvajanja (1.5 h uz konstantni napon od 100 V) proteini su preneseni s gela na membranu.

3.4.4 Imunokemijska detekcija

Mini-Trans Blot (BIO-RAD, SAD). Filtar papir (BIO-RAD, SAD), membrana (nitrocelulozna membrana, veličine pora 0.2 µm BIO-RAD, SAD), gel i spužvice koje se dobiju uz sustav za prijenos, ekvilibrirane su 30 minuta u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanola, pH 8.3) na +4°C. Potom je prema uputama proizvođača složen tzv. "sendvič" s gelom i membranom koji je

umetnut u kadnicu s blokom za hlađenje i puferom za prijenos proteina. Proteini prelaze iz gela na membranu u smjeru katode uz pomoć struje konstantne jakosti 200 mA 1.5 h uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Uspješnost prijenosa proteina na membranu provjerena je uz pomoć boje AmidoBlack (0.1% AmidoBlack, Sigma, SAD, 25% izopropanol, 10% octena kiselina) nakon čega je boja s membrane uklonjena uz pomoć otopine koja je sadržavala 25% izopropanola i 10 % octene kiseline. Membrana je potom isprana 2x15 minuta u puferu TBST-u (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween-20 (Sigma, SAD)). Nakon ispiranja membrana je blokirana 45 minuta u otopini 4%-tnog nemasnog mlijeka u prahu (BIO-RAD, SAD) koje je otopljeno u TBST-u. Po završenom blokiranju membrane su inkubirane preko noći na +4°C uz trešnju u otopini primarnog antitijela usmjerenog na fosforilirani oblik MAPKAPK-2 (Phospho-MAPKAPK-2 (Thr334) Rabbit mAb, Cell Signaling, SAD) razrijeđeno 1:1000 u koncentraciji (antitijelo je razrijeđeno u 5%-tnoj otopini albumina goveđeg seruma koji je otopljen u TBST-u). Idućeg dana membrana je isprana 4x15 minuta u TBS-T-u na sobnoj temperaturi i inkubirana jedan sat također na sobnoj temperaturi sa sekundarnim poliklonalnim antitijelom konjugiranim s peroksidazom hrena, (anti-rabbit IgG, DakoCytomation, Nizozemska). Sekundarno antitijelo razrijeđeno je s 0.5%-tnom otopinom za blokiranje iz komercijalnog paketa za kemiluminiscencijsku detekciju (Roche, Švicarska) u omjeru 1:1000. Prije detekcije membrana je ponovo isprana 4x15 minuta u TBST-u inkubirana u otopini za detekciju komercijalnog paketa za kemiluminiscencijsku detekciju (Perkin-Elmer, SAD) 1 minutu. Membrana je potom kratko posušena na filter papiru, prekrivena prozirnom folijom i slikana u sustavu za slikanje VersaDoc (BIO-RAD, SAD).

3.5 Izolacija ukupne RNK iz stanica

Izolacija ukupne RNK je provedena uz pomoć komercijalnog paketa RNeasy Mini Kit (Qiagen, SAD) prema uputama proizvođača. Stanice su odvojene od podloge uz pomoć 0,25%-tne TirpLE Expressa (GIBCO Invitrogen, SAD). Stanice su dva puta isprane s PBS-om kako bi se uklonili svi ostaci medija. Nakon ispiranja u PBS-u na stanice je dodano 600 μ L pufera RLT uz dodatak 10 μ L β -merkapt-etanola (Kemika, Zagreb). Na tako pripremljenu suspenziju stanica dodano je 600 μ L 70%-tnog etanola nakon čega se uzorak homogenizirao. 700 μ L uzorka se potom nanijelo na kolonu „RNeasy“ koja sadrži membranu za vezanje molekula RNK. Kolona je centrifugirana 15 sekundi na 10000 rpm. Tekućina koja je prošla kroz kolonu je odbačena, a ostatak uzorka stavljen je na kolonu te se čitav postupak ponovio. Kolona je isprana puferom RW1 iz komercijalnog paketa, centrifugirana 15 sekundi na 10.000 rpm, nakon čega je uslijedila inkubacija s DNazom koja razgrađuje zaostalu DNK. Nakon tretmana s DNazom kolona je isprana s puferom RW1 i dva puta s puferom iz komercijalnog paketa RPE. Nakon ispiranja, RNK koja se vezala na kolonu eluirana je dodatkom 30 μ L vode bez RNaza i DNaza (Gibco, SAD). Koncentracija otopljene RNK je određena fluorimetrijski (Qubit fluorimetar, Invitrogen, SAD) nakon čega je RNK pohranjena na -80°C .

3.6 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

QRT-PCR (engl. *Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction*) omogućuje kvantifikaciju i umnožavanje željene sekvence DNK. Nosi naziv „real-time“ jer omogućuje praćenje povećanja umnožene DNK tijekom reakcije u stvarnom vremenu. Metoda se temelji na lančanoj reakciji polimerazom pri čemu se oslobađa fluorescentna boja zbog čega se metoda koristi ne samo za umnažanje već i za istovremenu kvantifikaciju ciljnog odsječka/molekule DNK.

Kvantifikacija gena se vršila na temelju analize relativnog broja kopija odsječka DNK u odnosu na tzv. „normalizirajuće“ gene. U ovom je istraživanju kao fluorescentna molekula korišten SYBRgreen (Invitrogen).

3.6.1 Reverzna transkripcija

Početnice za gene kao i sve potrebne kemikalije za reverznu transkripciju kupljene su od tvrtke AppliedBiosystems, SAD. Eksperimentalna procedura provedena je prema uputama proizvođača. Ukratko, izolirana RNK se pomoću komercijalnog paketa High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, SAD) prevela u sondu (cDNK). Reakcijska smjesa je sadržavala 1.5 µg ukupne RNK u volumenu od 20 µL te sljedeće sastojke paketa: 2 µL 10X pufera za reverznu transkripciju, 0.8 µL 25X smjese dNTP (100mM), 2.0 µL nasumičnih početnica, 1.0 µL enzima MultiScribe RT (50U/ µL) te 3.2 µL QH₂O tako da je ukupni volumen bio 40 µL. Reakcija je provedena u uređaju Veriti (Applied Biosystems, SAD) kroz 10 minuta na 25°C, 120 minuta na 37°C, 5 sekundi na 85°C, a reakcijska smjesa ohlađena je na 4°C.

3.6.2. „qRT –PCR“

Nukleotidni sljedovi za početnice odabrani su uz pomoć programa za kreiranje početnica dostupnog na internetskoj stranici <http://eu.idtdna.com/site>. Uvjeti reakcije su određeni za svaki pojedini par početnica gena navedenih u tablici. Najprije su utvrđene temperature nalijeganja početnica, zatim efikasnost reakcije 95%-100% te temperatura mekšanja. Također je na 12% akrilamidnom gelu (akrilamid/bisakrilamid 40%, 10xTBE, H₂O, 10% amonij-persulfat, TEMED) utvrđena veličina fragmenata i čistoća umnoženog fragmenta.

Tablica 1. Početnice i uvjeti reakcije korišteni u pokusima

| Gen | | Slijed 5'-3' | veličina | uvjeti |
|---|-----|--------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Trombospondin-1 (THBS-1) | For | CCCGTGGTCATCTTGTCTGT | 133bp | 59°C 3.5mM MgCl ₂ |
| | Rev | TTTCTTGCAGGCTTTGGTCTCC | | |
| Kolagen 1A1 (COL1A1) | For | TGGCCCAGAAGAAGTGGTACATCA | 87bp | 60°C 3 mM MgCl ₂ |
| | Rev | ACTGGAATCCATCGGTCATGCTCT | | |
| Rho GDP- disocijacijski inhibitor alfa (ARHGDI A) | For | CAGGAAAGGCGTCAAGATTG | 81bp | 59°C 3 mM MgCl ₂ |
| | Rev | GTCAGGAACTCGTACTCCTC | | |
| Paladin (PALLD) | For | ATGGATTGAGACTGCATGGTGGCA | 182bp | 60°C 3.5mM MgCl ₂ |
| | Rev | GCAAAGTTTCATGGCAGCAGGGAA | | |
| v-erb-b2 eritroblastični onkogen leukemije homolog 2 (ERBB2) | For | GTGGCCATCAAAGTGTGAGGGAA | 166bp | 60°C 3.5 mM MgCl ₂ |
| | Rev | AGCCATAGGGCATAAGCTGTGTCA | | |
| Prokolagen III A (PROCOLIIIA) | For | TGGCTACTTCTCGCTCTGCTT | 132bp | 60°C 3.5mM MgCl ₂ |
| | Rev | CGGATCCTGAGTCACAGACACA | | |
| α-glatki mišićni aktin (α-SMA) | For | AAACAGGAATACGATGAAGCCGGG | 160bp | 60°C 3.5 mM MgCl ₂ |
| | Rev | ACGAGTCAGAGCTTTGGCTAGGAA | | |
| Fibronektin (FN) | For | GGAGAATTCAAGTGTGACCCTCA | 73bp | 60°C 3mM MgCl ₂ |
| | Rev | TGCCACTGTTCTCCTACGTGG | | |
| Fibronektin ekstra tip III domena A (ED-A) | For | AGGACTGGCATTCACTGATGTG | 86bp | 60°C 3m M MgCl ₂ |
| | Rev | GTCACCCTGTACCTGGAACTTG | | |
| Fibronektin ekstra tip III domena B (ED-B) | For | GGTGGACCCCGCTAAACTC | 67bp | 60°C 3.5 mM MgCl ₂ |
| | Rev | ACCTTCTCCTGCCGCAACTA | | |
| inzulinu sličnog receptora faktora rasta 1 (IGFR-1) | For | TGAAAGTGACGTCCTGCATTTTC | 75bp | 60°C 3 mM MgCl ₂ |
| | Rev | CGGTGCCAGGTTATGATGATG | | |
| 18s ribosomska RNK(S18-rRNA) | For | GTAACCCGTTGAACCCCAT | 151bp | 60°C 3.5mM MgCl ₂ |
| | Rev | CCATCCAATCGGTAGTAGCG | | |
| Inhibitor plazminogen aktivatora (PAI-1) | For | TGGAACAAGGATGAGATCAG | 262 bp | 60°C 3 mM MgCl ₂ |
| | Rev | CCGTTGAAGTAGAGGGCATT | | |

| | | | | |
|---|-----|---------------------------|--------|-------------------------------------|
| Tkivni inhibitor matriksmetaloproteinaza 1 (TIMP-1) | For | AGGCTCTGAAAAGGGCTTCCA | 150 bp | 60°C 3 mM MgCl ₂ |
| | Rev | GAGTGGGAACAGGGTG GACA | | |
| Hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaza (HPRT) | For | CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA | 126 bp | 60°C 3 mM MgCl ₂ |
| | Rev | TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA | | |
| Beta-2 mikroglobulin (B2M) | For | GACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGG | 133 bp | 60°C 3.5 mM MgCl ₂ |
| | Rev | CGATCCCACTTAACATCTTGGGC | | |

Ukupni volumen reakcijske smjese je iznosio 25 µl: 1X pufer (10 mM tris-HCl pH 8.3, 80 mM KCl) 3-3.5 mM MgCl₂, dNTP 0.2 mM, početnica F 0.2 µM, početnica R 0.2 µM, 10X SYBR Green, 100X ROX i Taq polimeraza (100 U). Reakcije qRT-PCR izvedene su u sljedećim uvjetima: pred-denaturacija 95°C tijekom 3 min., denaturacija 95°C tijekom 1 min., nalijeganje početnica 59-60°C 30 sekundi i 10 sekundi na 72°C, 40 ciklusa. RT-PCR se proveo na uređaju Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, SAD). U uzorcima se je odredila i ekspresija gena B2M i S18-rRNA koji su služili kao kontrolni geni. Rezultati su analizirani uz pomoć programa Expression Software Tool (REST-384) koji se nalazi na internetskoj stranici <http://www.gene-quantification.de/rest-384.html>

3.7 Ekspresija gena vezanih za upalne i autoimune bolesti

Za analizu ekspresije gena uključenih u upalni i autoimuni odgovor je korišten komercijalni kit RT² Profiler PCR Array: Human Inflammatory Response and Autoimmunity PAHS-077A (SABiosciences). Uz pomoć ove metode moguće je u samo jednom eksperimentu odrediti razinu ekspresije za 84 gena. Analiza je provedena u skladu s uputama proizvođača. RNK se prethodno pročistila u puferu za uklanjanje genomske DNK. Reakcijska smjesa je sadržavala 1000 ng RNK i 2 µL 5X gDNK eliminacijskog pufera u ukupnom volumenu od 10 µL. Smjesa je inkubirana na 42°C 5 min., a nakon toga ohlađena na ledu 1 minutu. RNK se pomoću kita za reverznu transkripciju prevela u sondu (cDNK).

Reakcijska smjesa je sadržavala 1000 ng ukupne RNK u volumenu od 10 μ L (reakcijska smjesa za eliminaciju genomske DNK) te sljedeće sastojke kita: 4 μ L 5X pufera za reverznu transkripciju, 1 μ L početnica, 2 μ L smjese enzima za reverznu transkripciju i 3 μ L QH₂O tako da je ukupni volumen bio 20 μ L. Reakcija je provedena u uređaju Veriti (Applied Biosystems, SAD) 15 minuta na 42°C a zatim 5 minuta na 95°C. Nakon toga je svaki uzorak resuspendiran sa 91 μ L QH₂O i ostavljen na ledu. Reakcijska smjesa za umnažanje gena je sadržavala 1275 μ L 2X SABiosciences RT qPCR master mix, 102 μ L cDNK i 1173 μ L QH₂O. U svaku od 96 jažica dodano je po 25 μ L navedene smjese. Reakcija je provedena tijekom 10 minuta u uređaju na 95°C, 1 ciklus, a zatim 15 sekundi na 95°C i 1 minuta na 60°C, 40 ciklusa. Na temelju ct vrijednosti istraživanih i kontrolnih gena, obrada podataka je napravljena u programu koji se nalazi na internetskoj stranici <http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>.

Tablica 2. Prikaz rasporeda istraženih gena na mikrotitarskoj ploči RT² Profiler PCR Array: Human Inflammatory Response and Autoimmunity PAHS-077A (SABiosciences)

| | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|-------|-------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| BCL6 | C3 | C3AR1 | C4A | CCL11 | CCL13 | CCL16 | CCL17 | CCL19 | CCL2 | CCL21 | CCL22 |
| CCL23 | CCL24 | CCL3 | CCL4 | CCL5 | CCL7 | CCL8 | CCR1 | CCR2 | CCR3 | CCR4 | CCR7 |
| CD40 | CD40LG | CEBPB | CRP | CSF1 | CXCL1 | CXCL10 | CXCL2 | CXCL3 | CXCL5 | CXCL6 | CXCL9 |
| CXCR4 | FASLG | FLT3LG | FOS | HDAC4 | IFNG | IL10 | IL10RB | IL18 | IL18RAP | IL1A | IL1B |
| IL1F10 | IL1R1 | IL1RAP | IL1RN | IL22 | IL22RA2 | IL23A | IL23R | IL6 | IL6R | IL8 | IL8RA |
| IL8RB | IL9 | ITGB2 | KNG1 | LTA | LTB | LY96 | MYD88 | NFATC3 | NFKB1 | NOS2A | NR3C1 |
| RIPK2 | TIRAP | TLR1 | TLR2 | TLR3 | TLR4 | TLR5 | TLR6 | TLR7 | TNF | TNFSF14 | TOLLIP |
| B2M | HPRT1 | RPL13A | GAPDH | ACTB | HGDC | RTC | RTC | RTC | PPC | PPC | PPC |

3.8 Analiza proteina primarnih kultura stanica izlučenih u hranjivi medij

3.8.1 Izolacija izlučenih proteina iz hranjivog medija

Stanični medij je prikupljen nakon 16 sati inkubacije primarnih kultura stanica (ND stanice) s TGF- β 1 sa/bez inhibitora fosforilacije p38 te su u njega dodani inhibitori proteaza (150 μ l). Medij je zatim centrifugiran 15 minuta na 1500 rpm kako bi se uklonile stanice iz medija. Nakon toga je ukoncentriran filtracijom kroz tzv. kolone centrikone s porama veličine 3 kDa (Amicon Ultra, Millipore) pri 12000 rpm na 4°C. Ukupno je 200 μ l ukoncentriranog medija potom resuspendirano s 200 μ l pufera koji je sadržavao 7M ureu, 2M tioureu, 4% CHAPS, 0.2% smjesu amfolita pH 3-10, 1% ditionitrol (DTT) i 1X koktel inhibitora proteaza (Roche). Medij se centrifugirao na 5000 rpm tijekom 8 sati u malim kolonama centrikon. Uzorci su pohranjeni na -80°C.

Za razdvajanje proteina prema relativnoj molekularnoj masi (Mr) uz pomoć denaturirajuće elektroforeze na uspravnom poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev dodecilsulfat (SDS-PAGE) koristio se sustav Mini-Protean (BIO-RAD, SAD). Postupak je prethodno detaljno opisan u poglavlju 'Western blot'. U jažice je nanijeto po 30 μ g proteina.

Za bojanje gelova korištena je otopina boje Coomassie Brilliant Blue sljedećeg sastava: 0.125 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD), 125 ml metanola (Kemika), 25 ml octene kiseline (Kemika) i 100 ml H₂O. Prethodno je gel fiksiran 1 sat u otopini sastava: 250 ml metanola (Kemika), 50 ml octene kiseline (Kemika) nadopunjeno do 500 ml H₂O. Nakon 10 minuta bojanja gela uslijedilo je odbojavanje u otopini (10% metanola, 7% octene kiseline) dok se ne izgubi intenzivno plavo obojenje pozadine gela. Obojani gelovi su skenirani uz pomoć uređaja za slikanje (VersaDoc Imaging System, model 4000, BIO-RAD) pri vremenu ekspozicije od 0.6 sekundi. Kvalitativna analiza gelova provedena je uz pomoć specijalnog računalnog programa za analizu 2-DE gelova (PDQuest SW, verzija 7.0, BIO-RAD). Gelovi su normalizirani prije analize tzv. metodom ukupne gustoće na slici gela (engl. *total density in gel image*), kod koje se

zbrajaju vrijednosti optičkih gustoća svih piksela unutar slike, a usporedba tih vrijednosti služi kao osnova za normalizaciju.

3.8.2 Priprema uzoraka za analizu na spektrometru masa

Proteinski spotovi su ručno izrezani iz gela i stavljeni u plastične epruvete (1.5 mL, Eppendorf) u kojima se nalazila otopina za odbojavanje (40% metanola, 10% octene kiseline). Minimalno 12 sati nakon odbojavanja komadići gela se prebace u 500 µl otopine 50 mM amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) da se gel omekša. Komadići gela se inkubiraju 2 puta po 5 minuta u termomikseru (500 rpm) na sobnoj temperaturi, nakon čega se svaki put otopina amonij-hidrogenkarbonata ukloni. Slijedi ispiranje u 500 µl amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8), 30 min. na termomikseru pri 500 rpm. Ostatak otopine je uklonjen, a u svaku epruvetu s komadićem gela dodano je 500 µl otopine 50% 50mM amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) u 50% aceto-nitrila (MeCN) te se stavi u termomikser 30 min na 500 rpm. Ostatak se nakon toga baci, a u epruvete se doda po 100 µl aceto-nitrila tako da potpuno prekrije gel. Takvi uzorci se stave 5 minuta na termomikser pri 500 rpm. Ostatak se baci, a epruvete se stave u vakuum-pumpu (Speed-Vac, Eppendorf) dok supernatant u potpunosti ne ispari. Zatim se u svaki uzorak dodaje približno 20 µl tripsina (Merck, Njemačka) tako da se prethodno pripremi 20 µg/ml otopine tripsina u amonij-hidrogenkarbonatu, a sve se to priprema u malim kivetama od 200 µl. Takvi uzorci se inkubiraju 18 sati na 37°C pri 500 rpm. Nakon toga se iz uzoraka uzme tripsinski pufer i na vakuum pumpi se liofilizira. U preostale komadiće gela se doda po 15 µl otopine 50% 5%-tne otopine triflouroctene kiseline (TFA) i 50% aceto-nitrila (MeCN), inkubira se 30 min. u sonikacijskoj kupelji te 30 min. u termomikseru. Zatim se ekstrakti spoje i liofiliziraju u vakuum pumpi na 20°C. Uzorci se zatim otupe u 10 µl 0.1% TFA i pročiste uz pomoć kolona Zip Tip (ZipTip C₁₈, Merck Millipore, Njemačka). Zip Tip služi da se od peptida odvoje soli, komadići gela, ostaci Coomassie boje, APS, TFA, MeCN itd. Najprije se kolone kondicioniraju tako da se u tri puta isperu s 10 µl 80% MeCN, 20% H₂O s 0.1% TFA. Zatim slijedi ispiranje tri puta s

po 10 μl 50% MeCN, 50% H_2O s 0.1% TFA. Zadnji korak kondicioniranja kolone uključuje ispiranje tri puta s po 10 μl 0.1% TFA. Slijedi vezanje uzorka, koji je otopljen u 0.1% TFA, tako da se uzorak 10 puta provuče gore dolje kroz kondicioniranu kolonu jer se na ovaj način peptidi vežu na kolonu. Nakon toga se kolona ispere 5 puta sa po 10 μl 0.1% TFA. Uzorak se eluira tako da se u kolonu uvuče 10 μl 80% MeCN, 20% H_2O s 0.1% TFA i odpipetira u novu ependorficu. Postupak se ponovi 10 puta. Uzorak se osuši u vakuum pumpi, nakon čega je liofiliziran. Zatim se uzorak pomiješa sa matricom (CHCA) i nanosi na pločicu. Ukupno se dodaje 5 μl matrice, a na pločicu se nanosi 1 μl .

3.8.3 Identifikacija proteina primarnih kultura stanica izlučenih u hranjivi medij uz pomoć spektrometrije masa

Spektrometrija masa (*engl. mass spectrometry*, MS) je metoda za razdvajanje ioniziranih atoma ili molekula prema omjeru mase i naboja (m/z) te se koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula kao i za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama. Osnovni dijelovi spektrometra su: ionski izvor, analizator masa i ionski detektor. Princip rada spektrometra masa je slijedeći: analizirani uzorak se uvodi u izvor iona u tekućem ili plinskom stanju gdje se ionizira i fragmentira. Nastali ioni putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema omjerima m/z a potom odlaze u detektor koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što u konačnici daje spektre masa peptida. Postoji nekoliko različitih metoda ionizacije, među kojima su ionizacija elektro-raspršenjem (*engl. electrospray ionization*, ESI; Fenn i sur. 1989) i matricom potpomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (*engl. matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI; Karas i Hillenkamp 1988).. Kod tehnike MALDI koja je korištena u ovom istraživanju, uzorak se pomiješa sa spojem koji apsorbira UV zračenje, tzv. Matricom (*engl. matrix*), poput primjerice α -cijano-4-hidroksi-trans-cimetnom kiselinom (CHCA) ili sinapiničnom kiselinom (SA), stavi na metu (*engl. target plate*) i kristalizira. Smjesa se potom pobuđuje laserom uzrokujući isparavanje matrice uslijed čega ona prenosi molekule uzorka u

plinsku fazu. Ioni uzorka su obično jednostruko protonirane molekule i stvaraju se uslijed razmjene elektrona i protona između uzoraka i pobuđene matrice.

Analizatori masa su ključna točka u MS-analizi. Četiri najčešće korištena analizatora u proteinskim istraživanjima su: kvadrupol (engl. *quadrupole*), analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *time-of-flight, TOF*), ionska stupica (engl. *ion trap*) i analizator ionsko ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR*). MALDI je obično povezan s TOF analizatorima koji mjere masu intaktnih peptida. Nadalje, kolizijom induciranom disocijacijom (engl. *collision-induced dissociation, CID*) s molekulama internog plina moguće je dobiti spektre ionskih fragmenata nastalih iz izabranih iona prekursora (Geoghegan and Kelly 2005). Ukoliko je potrebna strukturalna analiza iona produkata nastalih iz molekule nepoznatog uzorka s ciljem strukturne identifikacije uzorka, koristi se tandem ska spektrometrija masa (MS/MS) koja ima dva ili tri analizatora odvojena tzv. kolizijskom ćelijom (engl. *collision cell*)

Najjednostavnija metoda za strukturnu analizu proteina u proteomskim istraživanjima je tzv. metoda otiska prsta, odnosno identifikacija proteina na temelju određivanja masa njihovih peptidnih fragmenata (engl. *peptide mass fingerprinting, PMF*). Nepoznati protein se izreže iz gela i podvrgne digestiji uz pomoć primjerice tripsina, proteaze koja specifično cijepa proteine na karboksilnom kraju argininskih i lizinskih ostataka (Steen i Mann 2004). Tako pocijepani proteini različitog aminokiselinskog slijeda stvaraju seriju masa peptida koja se može detektirati uz pomoć MALDI-TOF spektrometra masa. Spektar dobivenih masa npr. triptičkih peptida jedinstven je za svaki pojedini protein poput otiska prsta (engl. *mass fingerprint*). Usporedbom izmjerenih masa peptidnih fragmenata nepoznatog proteina sa *in silico* generiranim, pretpostavljenim masama peptida dobivenih teoretskom digestijom proteina s npr. tripsinom u dostupnim proteinskim bazama podataka (Swiss-Prot, <http://www.expasy.org/sprot>) moguće je identificirati nepoznati protein.

U ovom istraživanju su odabrane proteinske točke izrezane iz gela i podvrgnute digestiji tripsinom. Identifikacija proteina napravljena je uz pomoć

metode MALDI-TOF/TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-time-of-flight*) na spektrometru masa 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) opremljenim sa 200 Hz i 355 nm Nd:YAG laserom u pozitivnom modulu reflektora (engl. *positive reflector mode*). Za svaki pojedini spot napravilo se 1600 snimaka po spektru sa rasponom mase od 550 do 3200 Da, fokusnom masom od 2000 Da i vremenom odgode od 500 ns. Pikovi dobiveni autolizom tripsina su korišteni za unutarnju kalibraciju masenog spektra, što omogućuje točnost masa unutar 21 ppm u odnosu na njihovu teoretsku masu. Metoda interpretacije se temelji na odabiru četiri najintenzivnija pika (ograničenje S/N 200) za tandemsku masenu spektrometriju (MS/MS) uz isključenje pikova nastalih zbog autolize tripsina, matrice ili akrilamida. MS/MS se izvodi pri energiji kolizije od 1 ili 2 kV (CID, engl. *collision induced dissociation*) i tlaku kolizijskog plina od približno 2×10^{-7} Tora.

3.8.4 Pretraživanje baze podataka u svrhu identifikacije proteina

Na temelju dobivenih spektara masa MS i MS/MS, uz pomoć specijaliziranog računalnog programa Mascot (Matrix Science, London, UK) pretražile su se baze podataka sa sljedovima humanih proteina u svrhu identifikacije željenih proteina. Korištene je baze podataka SwissProt. Za unos podataka dobivenih uz pomoć spektrometra masa MALDI-TOF/TOF tijekom pretraživanja baza koristio se računalni program GPS (engl. *Global Proteome Server*) Explorer Software version 3.6 (Applied Biosystems, SAD). Monoizotopne peptidne mase su korištene za MS i MS/MS pretraživanja baza sa sljedećim parametrima: minimalna dozvoljena greška peptidne mase 21 ppm, tolerancija mase fragmenta: +/- 0.3 Da, minimalno 5 S/N i jedno nepotpuno cijepanje po peptidu.

3.9 Određivanje kontrakcije primarnih stanica u kolagenskom gelu

3.9.1 Priprema otopine kolagena

Nakon sterilizacije 0.2% octene kiseline kroz 0.2 µm filter, otopina je pohranjena na 4°C. Kolagen tip I se miješa sa 0.2% octenom kiselinom u sterilnim uvjetima do konačne koncentracije 6 mg/mL. Nakon toga se otopina kolagena nježno miješa na magnetskoj miješalici na 4°C tijekom 3 dana dok se potpuno ne otopi. Nakon što se kolagen potpuno otopio, potrebno ga je razrijediti sa jednakim volumenom sterilne vode do koncentracije 3 mg/mL. Otopina se miješa još 1 dan na 4°C.

3.9.2 Titracija kolagena s NaOH

Za pH titriranje gelova korišteno je osam epruveta od 1.6 mL (Eppendorf). U svaku od njih dodano je 0.4 ml DMEM-a, a zatim i 0.2 ml suspenzije kolagena (3 mg/ml u 0.1% octenoj kiselini). Potom se dodaje 1 µl 1M NaOH i resuspendira s pipetom. Navedeni postupak se ponavlja povećavanjem količine 1M NaOH kako bi se odredila točna količina NaOH potrebna za stvaranje dobre gustoće gela s neutralnim pH. Otopina se ostavi 20 minuta na sobnoj temperaturi, odnosno koliko je potrebno za zgušnjavanje. Konačna koncentracija gela mora biti 1 mg/ml. Volumen NaOH koji stvara dobru gustoću gela s neutralnim pH se određuje usporedbom čvrstoće i boje gela titriranog s različitim volumenima NaOH. Najmanja količina NaOH potrebna za promjenu fenol crvenog medija u svijetlo ružičastu boju stvoriti će dovoljno gust kolagenski gel.

Priprema kolagenskih gelova sa stanicama se odvija u sterilnim uvjetima. Ukratko, u 200 µl suspenzije kolagena (3 mg/ml) i 2.5 µl NaOH dodaje se 0.66 volumena, odnosno 400 µl stanične suspenzije, (1.5×10^5 stanica/ml). Otopina se brzo resuspendira tri puta sa pipetom te se nanese 500 µl pripremljene gel-suspenzije stanica u bunarić na pločicu s 24 jažice (ploče sa ravnim dnom za uzgoj stanica, Falcon). Gel se ostavi 20 minuta na sobnoj temperaturi da se zgusne. Potom se uz rub stjenke dodaje jednak volumen hranjivog medija (500

μl) u svaki bunarić. Gel se od stjenke odvaja kruženjem uz rubove gela s nastavkom za pipetu. Tako pripremljene pločice pohrane se u inkubator na 37°C $5\% \text{CO}_2$. Nakon 24 sata pločica se postavi na svijetlu podlogu i fotografira digitalnom kamerom. Isti postupak ponovi se nakon 48 i 72 sata. Za analizu fotografija i određivanje površine gela korišten je ImageJ software od Nacionalnog instituta za zdravlje SAD (National Institute of Health, NIH). Površina gela u svakom trenutku mjerenja izražena je kao postotak površine u odnosu na početnu površinu gela.

3.10 Određivanje polimorfizama gena za IL-6 (174 G/C) rs1800795, IL-6 (572 G/C) rs1800796 i IL-6 (597 A/G) rs1800797

3.10.1 Izolacija DNK

Genomska DNK je izolirana iz periferne krvi pomoć komercijalnog paketa QIAamp DNK Blood Mini Kit (QIAGEN). $200 \mu\text{L}$ krvi je eluirano s $150 \mu\text{L}$ elucijskog pufera. DNK koncentracija je određena na UV spektrofotometru (Beckman Coulter DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer).

3.10.2 Određivanje polimorfizama metodom qRT-PCR

Metoda određivanje genotipova polimorfizama u jednoj bazi (SNP) se temelji na hibridizaciji ciljnog slijeda i fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde specifične za pojedini alel. Uslijed aktivnost DNA polimeraze i umnažanja ciljnog segmenta, dolazi do razdvajanja fluorofora od prigušivača (engl. *quencher*) prilikom cijepanja sonde u reakciji lančane reakcije polimerazom (PCR) pri čemu mjerimo fluorescentni signal. Pri tome se koriste dvije sonde od kojih je svaka komplementarna pojedinom alelu polimorfizma i obilježena je drugačijim fluoroforom (primjerice su to fluorofori VIC, FAM ili TEXAS RED). Stvaranje fluorescentnog signala s jednom ili obje sonde ukazuje na njihovo

vezanje tijekom reakcije PCR i oslobađanje molekule prigušivača što pokazuje prisutnost odgovarajućih alela DNK (Gibson 2006).

Ovom metodom određeni su polimorfizmi gena IL-6 (-174) i IL-6 (-572) uz pomoć početnica i specifičnih dvostruko-obilježenih fluorescentnih sonda za alelnu diskriminaciju (SIGMA-ALDRICH, SIGMA Life Science). Svaka oligonukleotidna sonda bila je obilježena na 5' kraju sa različitim fluoroforom (FAM ili Texas Red) i prigušivačem (Black Hole Quencher 1 ili Black Hole Quencher 2) na 3' kraju. Sve korištene početnice i sonde prikazane su detaljno u tablici 3.

Tablica 3. Početnice i sonde korištene u alelnoj diskriminaciji

| Gen | Početnice i sonde |
|-------------|---|
| IL-6 (-597) | Komercijalno korišten komplet pod zaštićenom oznakom (rs 1800797 Applied Biosystems) |
| IL-6 (-174) | Početnica 1: 5-CTCAATGACGACCTAA GC-3 Početnica 2: 5-AATCTTTGTTGGAGGGTG-3 Sonda 1 : 5-(6FAM)-TGTCTTGC C ATGCTAAAGGAC-(BHQ1)-3 Sonda 2 : 5-(TxRd)-TGTCTTGC G ATGCTAAAGGAC-(BHQ2)-3 |
| IL-6 (-572) | Početnica 1: 5-CACGAAATTTGAGGATGG-3 Početnica 2: 5-GGATTATGAAGAAGGTAATACTA-3 Sonda 1 : 5-(6FAM)-ACAACAGCC C CTCACAGG-(BHQ1)-3 Sonda 2 : 5-(TxRd)-ACAACAGCC G CTCACAGG-(BHQ2)-3 |

U volumenu od 25 µl, R reakcijska smjesa je sadržavala približno 100 ng DNK te sljedeće sastojke: 12.5 µl IQ supermix (Bio-Rad), 300 nM koncentracije svake početnice i 200 nM koncentracije svake sonde. Reakcija je provedena u uređaju iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Uvjeti reakcije su određeni za svaki par početnica i sonda uz pomoć temperaturnog gradijenta. U jednom koraku je testirano osam različitih temperatura u rasponu od 51°C do 71°C. Reakcija u uređaju je provedena tijekom 5 min. na 95°C, 45 ciklusa tijekom 15s na 95°C i 58°C tijekom 60 s. Analiza je rađena u triplikatu. Dobiveni rezultati

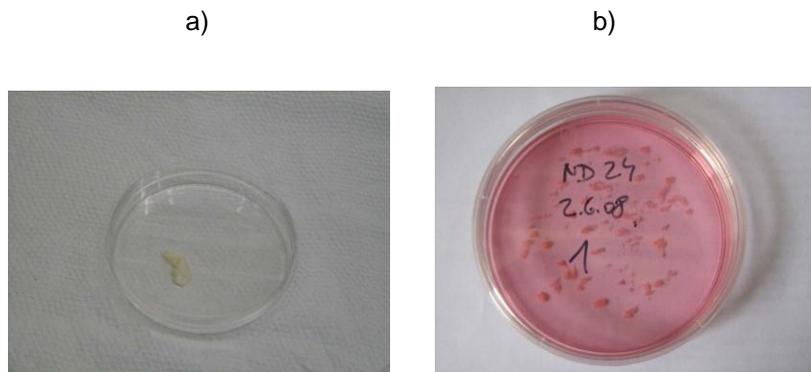
su obrađeni u računalnom programu proizvođača uz uređaj koji se koristi za analizu alelne diskriminacije.

Za određivanje polimorfizma IL-6 (-597 rs1800797) upotrijebljen je komercijalno dostupan komplet tvrtke Applied Biosystems (TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay), a reakcija je provedena na aparatu Applied Biosystems 7300 real-time PCR. Pri tome je univerzalna mješavina za PCR (Master Mix TaqMan, Applied Biosystems) razrijeđena 20X sa puferom TE. Svaka reakcijska smjesa je sadržavala 1.25 uL 20x pufera TE, 12.5 uL TaqMan Master Miksa i 11.25 uL razrijeđene DNK konačne koncentracije 2 ng. Uvjeti PCR reakcije su 95 °C 10 min, 40 ciklusa tijekom 15 s na 95 °C i 60°C tijekom 1 minute. Prikupljeni rezultati su analizirani uz pomoć softvera za alelnu diskriminaciju u PCR instrumentu (Applied Biosystems 7300).

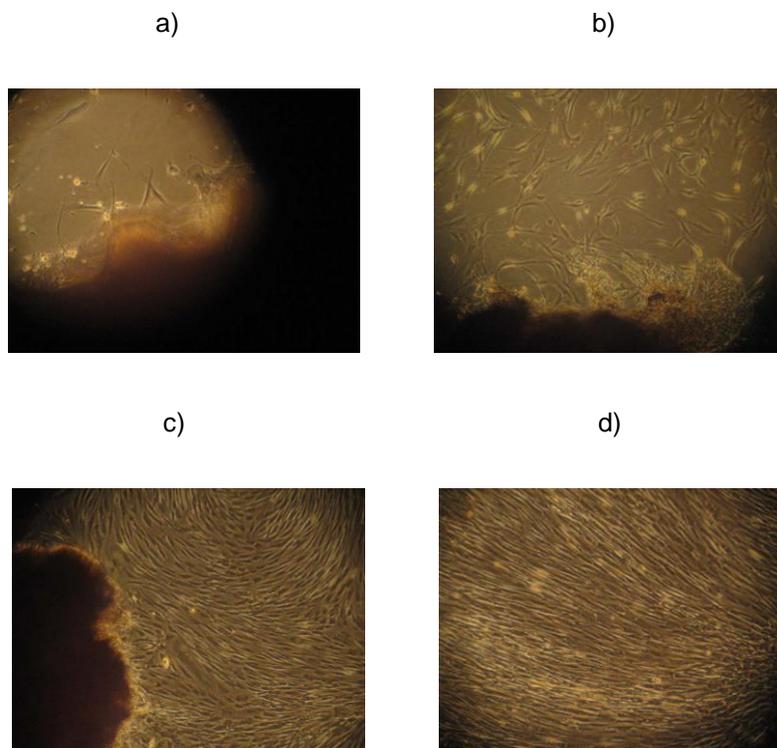
4. Rezultati

4.1 Primarne stanične kulture

Tkivo iz nezahvaćenog dijela palmarne fascije pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture korišteno je za uzgoj primarnih kultura stanica (ND) (Slika 12.). Uzgoj primarnih staničnih kultura prolazi kroz nekoliko faza dokumentiranih na slici (Slika 13.). Fibroblasti iz nezahvaćene fascije dlana pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture uzgajani su u kulturi do konfluentnosti od 90%, te su iz njih izolirani ukupna RNK, stanični proteini ili proteini staničnog medija koji su poslužili kao materijal za transkriptomski i proteomski istraživanja.



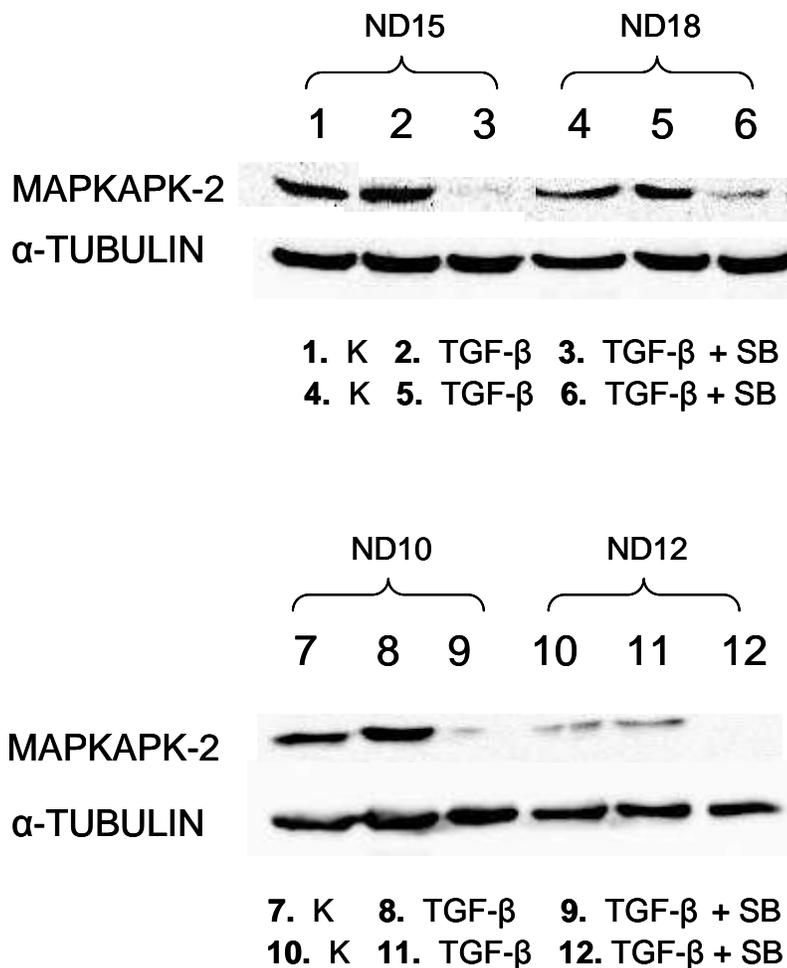
Slika 12. Tkivo iz nezahvaćenog dijela palmarne fascije pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture koje je korišteno za uzgoj primarnih kultura stanica: a) bolešću nezahvaćena fascija dlana; c) usitnjeni komadići tkiva u petrijevoj posudi u 10 mL hranjive podloge.



Slika 13. Uzgoj stanica iz usitnjenih komadića tkiva: a) mobilizacija stanica iz tkiva; b) proliferacija stanica; c) daljnja proliferacija i umnažanje stanica oko komadića tkiva; d) uklanjanje komadića tkiva i uzgoj stanica do konfluentnosti.

4.2 Analiza ekspresije kinaze MAPKAPK-2 u stanicama ND prije i nakon inhibicije signalnog puta p38 MAPK uz pomoć metode Western blot

Za analizu molekularnih događaja u stanicama ND koji su ovisni o signalnom putu p38 MAPK, a osobito analiza ekspresije profibroznih gena i proteina važnih za aktivaciju fibroblasta koji su pod kontrolom ovog signalnog puta, prethodno je istražena razina ekspresije aktivnog (fosforiliranog) oblika serin/treonin mitogen aktivirane protein kinaze MAPKAPK-2. Aktivnost ove kinaze regulira se primarno uz pomoć fosforilacije nizvodno od kinaze p38 MAPK koja je ujedno i njezin isključivi aktivator. Stoga smo proveli ciljanu analizu prisutnosti fosforilirane kinaze MAPKAPK-2 uz pomoć metode Western blot. Stanice ND tretirane s TGF- β 1 imale su sličnu razinu fosforilirane kinaze MAPKAPK-2 kao i kontrolne (netretirane) stanice. Tretmanom stanica s inhibitorom fosforilacije kinaze p38 SB203580 u kombinaciji s tretmanom stanica s TGF- β 1 nakon 16 sati došlo je do dokidanja/smanjenja ekspresije fosforilirane kinaze MAPKAPK-2 što ukazuje da je signalni put p38 MAPK uspješno inhibiran (Slika 14).

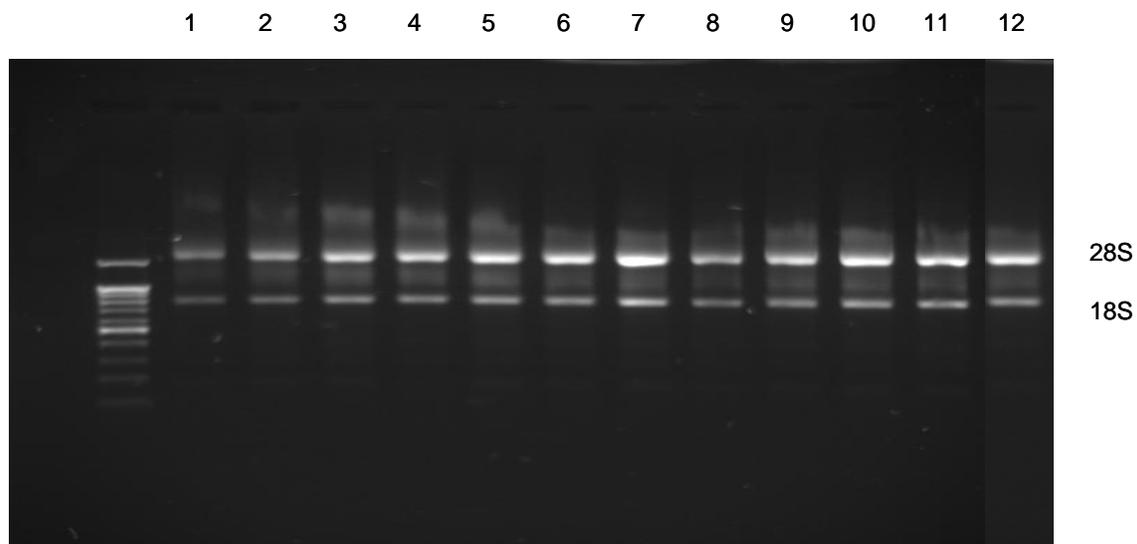


Slika 14. Analiza Western blot razine fosforiliranog oblika kinaze MAPKAPK-2 u fibroblastima ND (2. pasaža). Stanice su tretirane sa TGF- β 1 (3 ng/ml) i inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (na slici označen kao SB) (10 μ M) koji je dodan u hranjivi medij 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Nakon 16 sati tretmana, izolirani su ukupni proteini iz stanica i analiziran je stupanj fosforilacije kinaze MAPKAPK-2. α -tubulin je korišten kao kontrola nanošenja uzorka na gel.

4.3 Određivanje ekspresije pro-fibroznih gena metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom u realnom vremenu (qRT-PCR)

4.3.1 Kvaliteta izolirane RNK

Prije analize ekspresije gena uz pomoć metode qRT-PCR, ispitana je kvaliteta ukupne RNK na 1% agaroznom gelu. Pri tome je potvrđen integritet izolirane RNK za koji nužno treba vidjeti sačuvane dvije vrpce 28S i 18S (Slika 15).



Slika 15. Provjera kvalitete ukupne RNK izolirane iz primarnih kultura stanica ND na ogleđnom 1% agaroznom gelu. 1. ND15 K 2. ND15 TGF- β 1 3. ND15 TGF- β 1+SB; 4. ND18 K 5. ND18 TGF- β 1 6. ND18 TGF- β 1+SB; 7. ND10 K 8. ND10 TGF- β 1 9. ND10 TGF- β 1+SB; 10. ND12 K 11. ND12 TGF- β 1 12. ND12 TGF- β 1+SB

Nakon što je utvrđeno da je kvaliteta izolirane RNK zadovoljavajuća (gel i koncentracija), ista količina RNK iz svih uzoraka je prevedena reverznom transkripcijom u cDNK. Relativna ekspresija fibroznih gena je određena uz pomoć kvantitativne metode PCR u realnom vremenu (qRT-PCR). Ekspresija gena normalizirana je uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA, B2M i HPRT) koji su imali najstabilniju ekspresiju u svim uzorcima, a što je određeno uz pomoć programa GeNorm 3.5.

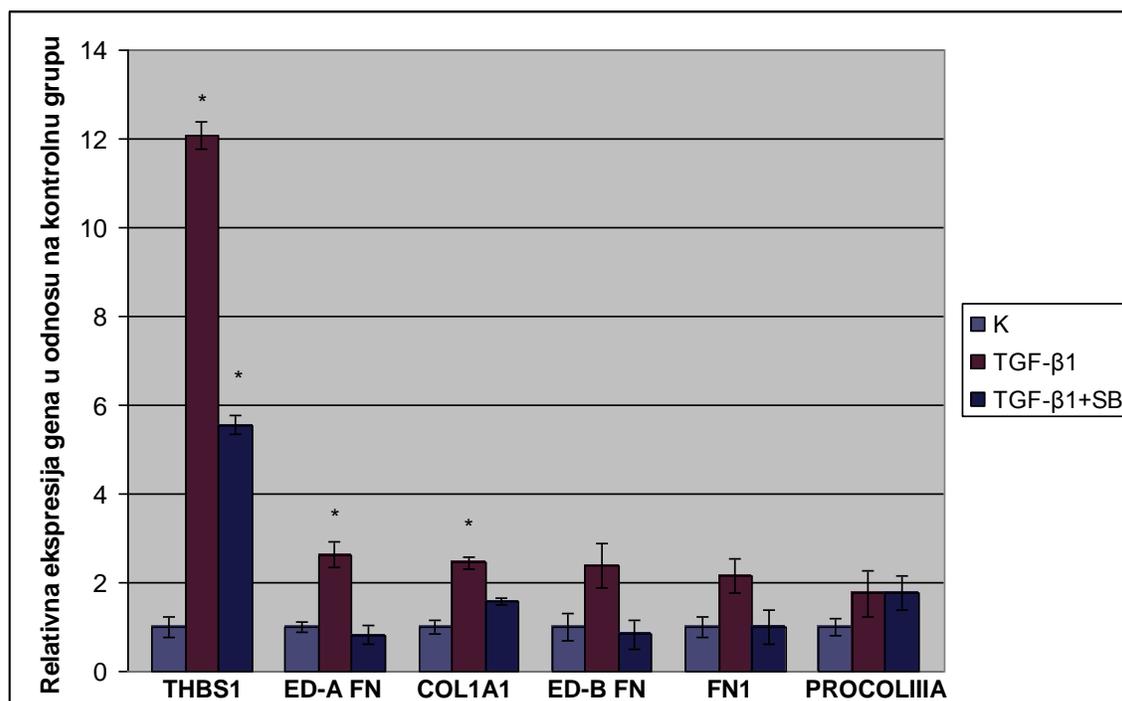
4.3.2 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (qRT-PCR)

Tijekom nastanka i razvoja Dupuytrenove kontrakture, TGF- β 1 potiče aktivaciju i diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste. Uloga TGF- β 1 u aktivaciji signalnog puta p38 MAPK u primarnim staničnim kulturama fibroblasta pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture ND ispitana je uz pomoć specifičnog inhibitora fosforilacije kinaze p38. U primijenjenom modelu *in vitro* praćen je učinak inhibicije fosforilacije p38 na ekspresiju pro-fibroznih gena. Pro-fibrozni geni su odabrani iz znanstvenih radova u kojima je utvrđena njihova povećana ekspresija u oboljelom tkivu fascije, kao i iz naših prethodnih istraživanja (O'Gorman i sur. 2010, Kraljević Pavelić i sur. 2008, Ratkaj i sur. 2012). U tu svrhu stanice 2. pasaže su tretirane sa TGF- β 1 (3 ng/ml) i kombinacijom TGF- β 1 i inhibitorom SB203580 (10 μ M) koji je dodan 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Ekspresija profibroznih gena nakon 16 sati tretmana je utvrđena metodom qRT-PCR obilježavanjem proba sa bojom SYBR green. Rezultati su analizirani uz pomoć programa Expression Software Tool (REST-384). Iz dobivenih rezultata je vidljivo kako je TGF- β 1 potaknuo ekspresiju gena-markera za diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste, pa je tako ekspresije α -glatkog mišićnog aktina (α -SMA) povećana za 3.4 puta a paladina 5.6 puta. Isto tako povećana je i ekspresija inzulina sličnog čimbenika rasta receptora 1 (IGFR-1) za 1.4 puta i Rho GDP-disocijacijskog inhibitora 1 (ARHGDI1) za 1.3 puta.

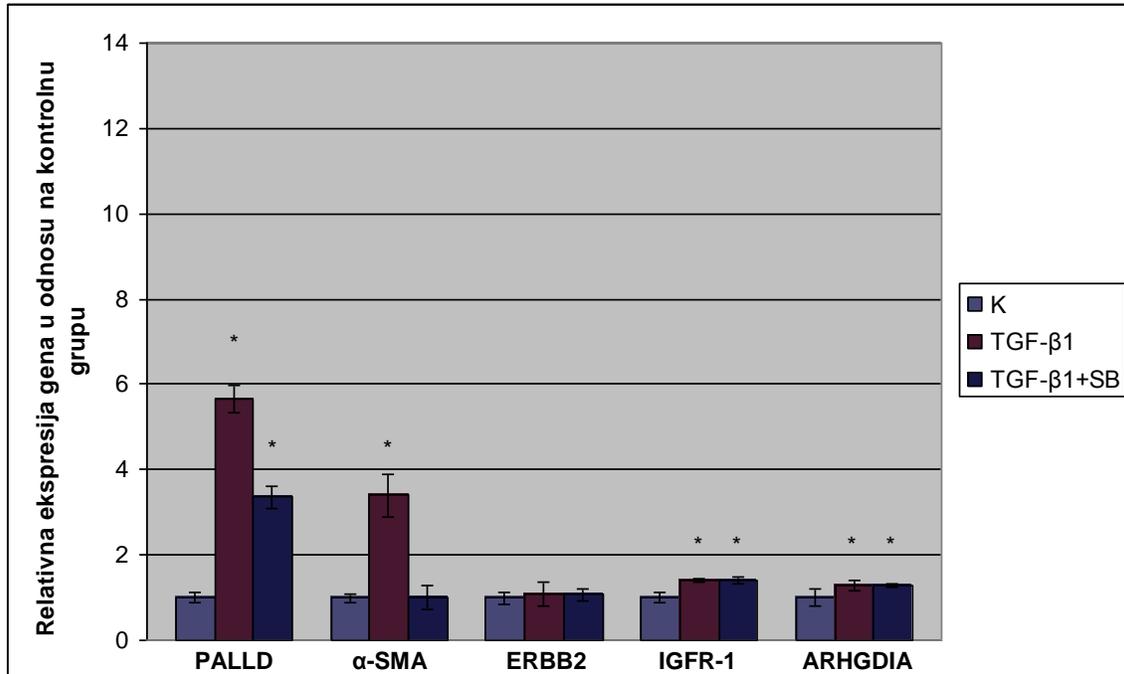
Jedna od važnih funkcija miofibroblasta je i povećana proizvodnja te odlaganje izvanstaničnih građevnih proteina i remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Tretiranje stanica sa TGF- β 1 (3 ng/mL) uzrokovalo je povećanje genske ekspresije izvanstaničnih proteina i to: trombospondina 1 (THBS1) za 12.1 puta, izoforme fibronektina s dodatnom domenom A (ED-A FN) za 2.6 puta, te kolagena tipa I, alfa 1 (COL1A1) za 2.5 puta.

Tretman stanica sa inhibitorom SB203580 (10 μ M) koji je dodan 30 minuta prije tretmana s TGF- β 1 (3 ng/mL) statistički je značajno umanjio fibrogeni

učinak TGF- β 1 što je bilo vidljivo kroz smanjenu ekspresiju pojedinih gena. Ekspresija paladina je povećana za 2.2 puta, trombospondina 5.6 puta, izoforma fibronektina ekstra domene A 0.8 puta i Kolagena, tip I, alfa 1 za 1.6 puta. Iako nije statistički značajno, primijećeno je i osjetno smanjenje ekspresije α -glatkog mišićnog aktina.



Slika 16. Relativna ekspresija profibroznih gena dobivena uz pomoć metode qRT-PCR: Trombospondin 1 (THBS1), izoforma fibronektina s dodatnom domenom A (ED-A FN), kolagen, tip I, alfa 1 (COL1A1), izoforma fibronektina s dodatnom domenom B (ED-B FN), fibronektin (FN1), prokolagen III alfa (PROCOL3A). Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) i inhibitorom SB203580 (10 μ M) koji je dodan 30 minuta prije tretmana stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) (16 sati) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i HPRT). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu. * statistički značajna razlika (p<0.05)



Slika 17. Relativna ekspresije fibroznih gena: Paladin (PALLD), α -glatki mišićni aktin (α -SMA), eritroblastični onkogen leukemije homolog 2 (ERBB2), inzulinu sličan čimbenik rasta receptor 1 (IGFR-1), Rho GDP-disocijacijski inhibitor 1 (ARHGDI1).

Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) i inhibitorom SB203580 (10 μ M) koji je dodan 30 minuta prije tretmana stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) (16 sati) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i HPRT). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu.

* statistički značajna razlika (p<0.05)

Tablica 4. Sažeti prikaz promjene genske ekspresije profibroznih gena u primarnim stanicama ND. Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) i p38 inhibitorom SB203580 (10 μ M) koji je dodan 30 minuta prije tretmana s TGF- β 1 (3 ng/mL) (16 sati) u uvjetima bez seruma. Povećana ekspresija označena je sa \uparrow a snižena ekspresija je označena sa \downarrow . Statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu je označena jače otisnutim slovima.

| Gen | Ime gena | TGF- β 1 | | TGF- β 1+SB | |
|------------------|--|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | | Povećanje ekspresije | p vrijednost | Povećanje ekspresije | p vrijednost |
| <i>THBS1</i> | Trombospondin 1 | \uparrow 12.1 | 0.013 | \uparrow 5.6 | 0.001 |
| <i>PALLD</i> | Paladin | \uparrow 5.6 | 0.001 | \uparrow 3.4 | 0.001 |
| α -SMA | α -glatki mišićni aktin | \uparrow 3.4 | 0.001 | \uparrow 1.0 | 0.971 |
| <i>ED-A FN</i> | Izoforma fibronektina s dodatnom domenom A | \uparrow 2.6 | 0.025 | \uparrow 0.8 | 0.571 |
| <i>COL1A1</i> | Kolagen, tip I, alfa 1 | \uparrow 2.5 | 0.001 | \uparrow 1.6 | 0.118 |
| <i>ED-B FN</i> | Izoforma fibronektina s dodatnom domenom B | \uparrow 2.4 | 0.221 | \uparrow 0.8 | 0.701 |
| FN1 | Fironektin | \uparrow 2.2 | 0.129 | \uparrow 1.0 | 0.942 |
| <i>PROCOL3A1</i> | Prokolagen III alfa | \uparrow 1.8 | 0.187 | \uparrow 1.8 | 0.187 |
| <i>ERBB2</i> | erb-b2 eritroblastični onkogen leukemije homolog 2 | \uparrow 1.1 | 0.800 | \uparrow 1.1 | 0.800 |
| <i>ARHGDI1</i> | Rho GDP-disocijacijski inhibitor 1 | \uparrow 1.3 | 0.025 | \uparrow 1.3 | 0.025 |
| <i>IGFR-1</i> | Inzulinu sličan čimbenik rasta receptor 1 | \uparrow 1.4 | 0.001 | \uparrow 1.4 | 0.001 |

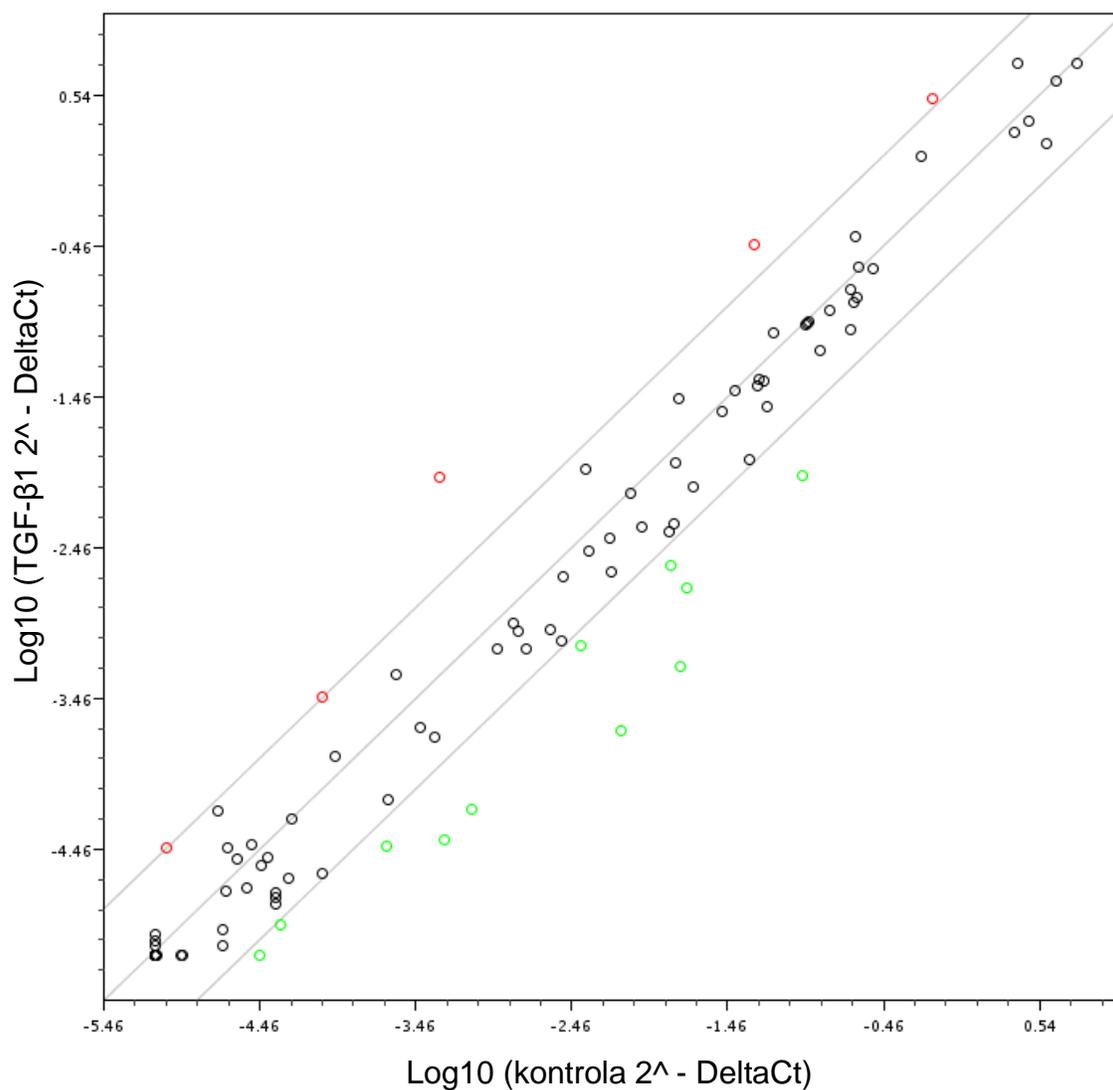
4.4 Ekspresija gena uključenih u upalne i autoimune bolesti

Ekspresija gena uključenih u upalni i autoimuni odgovor praćena je uz pomoć komercijalnog paketa RT² Profiler PCR Array: Human Inflammatory Response and Autoimmunity (SABioscience). Ovaj format pokusa omogućava paralelnu analizu ekspresije 84 imunološki relevantna gena. Jedan od najzastupljenijih citokina u Dupuytrenovoj kontrakturi je upravo TGF- β 1 koji aktivira čitav niz ostalih citokina i kemokina važnih za pokretanje upalnih reakcija u području oštećenja tkiva. Također je dokazano kako signalni put p38 MAPK koji se može aktivirati različitim citokinima ima važnu ulogu u upalnim procesima. Stoga smo ovim pokusom željeli utvrditi status ekspresije svih gena uključenih u upalni odgovor kod oboljelih od Dupuytrenove kontrakture. U tu smo svrhu inhibirali fosforilaciju kinaze p38 tako što su stanice 2. pasaže tretirane sa TGF- β 1 (3 ng/ml) i inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) koji je na stanice dodan 30 minuta prije stimulacije s TGF- β 1 (3 ng/mL). Ekspresija profibroznih gena u tretmanima je utvrđena metodom qPCR. Tretman s TGF- β 1 (3 ng/mL) uzrokovao je povećanje ekspresije 5 gena i snižavanje ekspresije 11 gena. Od toga, statistički značajno se povećala ekspresija kemokina 11 (CCL11) (21 put) i interleukina 6 (IL6) (7 puta), kao i pomoćnog proteina interleukin 1 receptora (2 puta).

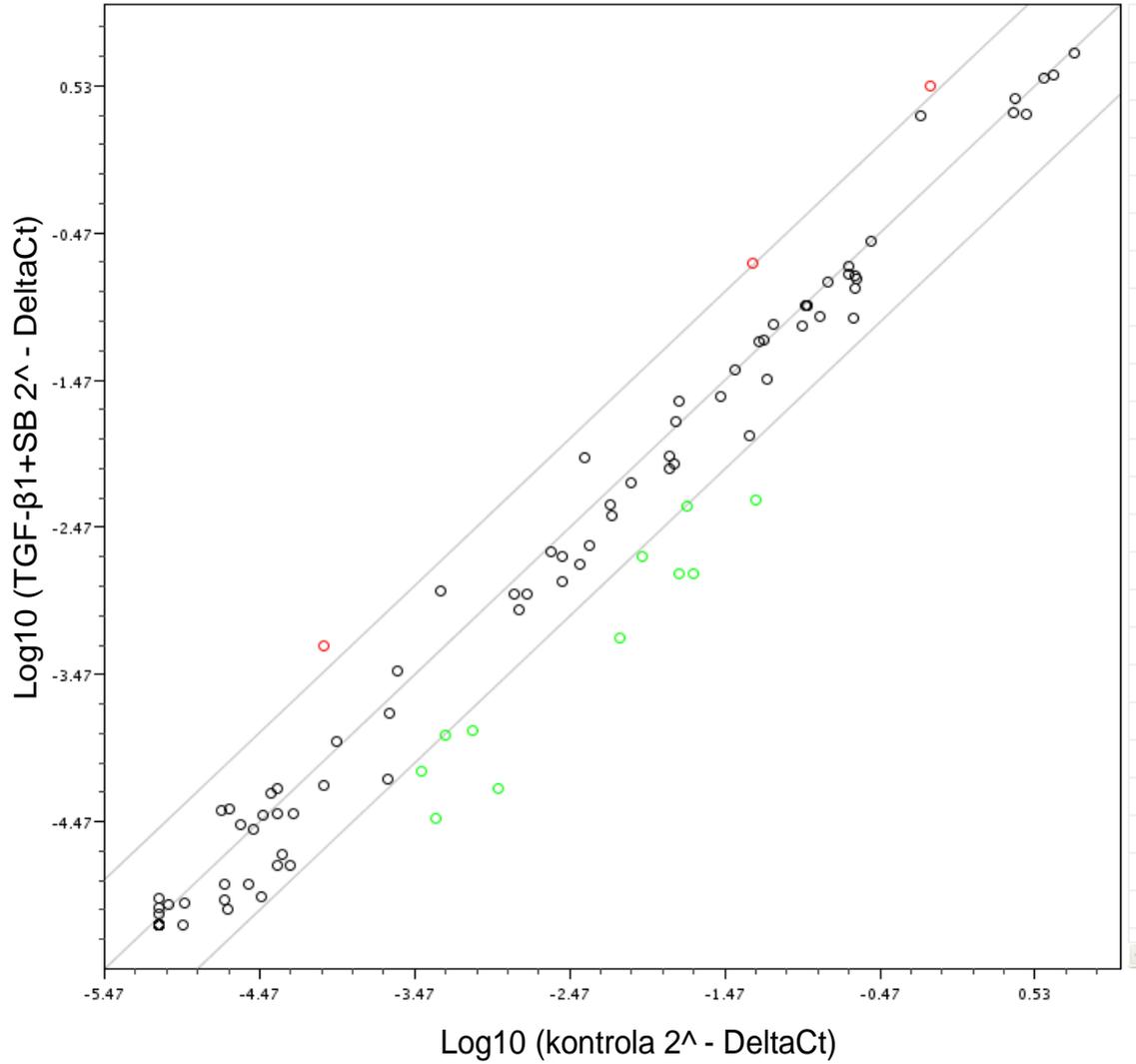
Istovremeno je TGF- β 1 statistički značajno smanjio ekspresiju navedenih gena: komponente komplementa 3 (C3) za 3 puta, ligandu fms-slične tirozin kinaze 3 (FLT3LG) za 3.5 puta, interleukin 6 receptora (IL6R) za 10 puta, limfocitnog antigena 96 (LY96) za 3 puta, Toll-interleukin 1 receptora (TIR), domene sa adaptornim proteinom (TIRAP) za 2.5 puta, Toll-u sličnog receptora 3 (TLR3) za 5.5, Toll-u sličnog receptora 5 (TLR5) za 5 puta i histon deacetilaze 4 (HDAC4) za 2 puta.

Prilikom tretmana stanica sa TGF- β 1 (3 ng/mL) i inhibitorom fosforilacije p38 (pri koncentraciji od 10 μ M) od ukupno 84 istraživana gena utvrđena je povećana ekspresija za 3 gena te snižena ekspresija za njih 11. Od toga

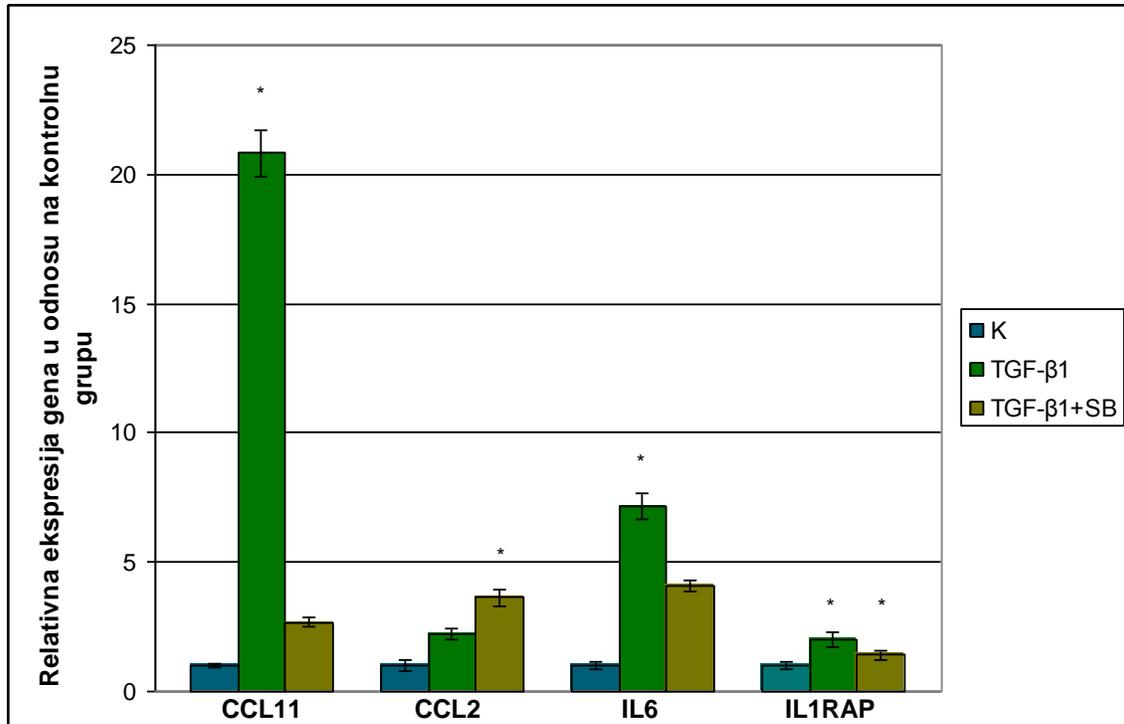
statistički značajno je bila povećana ekspresija pomoćnog proteina interleukin 1 receptora (IL1RAP) za 1.5 puta i kemokina 2 (CCL2) za 3.6 puta. Istovremeno je tretman s TGF- β 1 i inhibitorom fosforilacije p38 doveo do statistički značajno smanjene ekspresije navedenih gena: stimulirajućeg čimbenika kolonije 1 (CSF1) za 2.5 puta, ligandu fms-slične tirozin kinaze 3 (FLT3LG) za 3.3 puta, interleukin 6 receptora (IL6R) za 4 puta, Toll-interleukin 1 receptora (TIR) domene sa adaptornim proteinom (TIRAP) za 1.5 puta, histon deacetilaze 4 (HDAC4) za 1.9 puta.



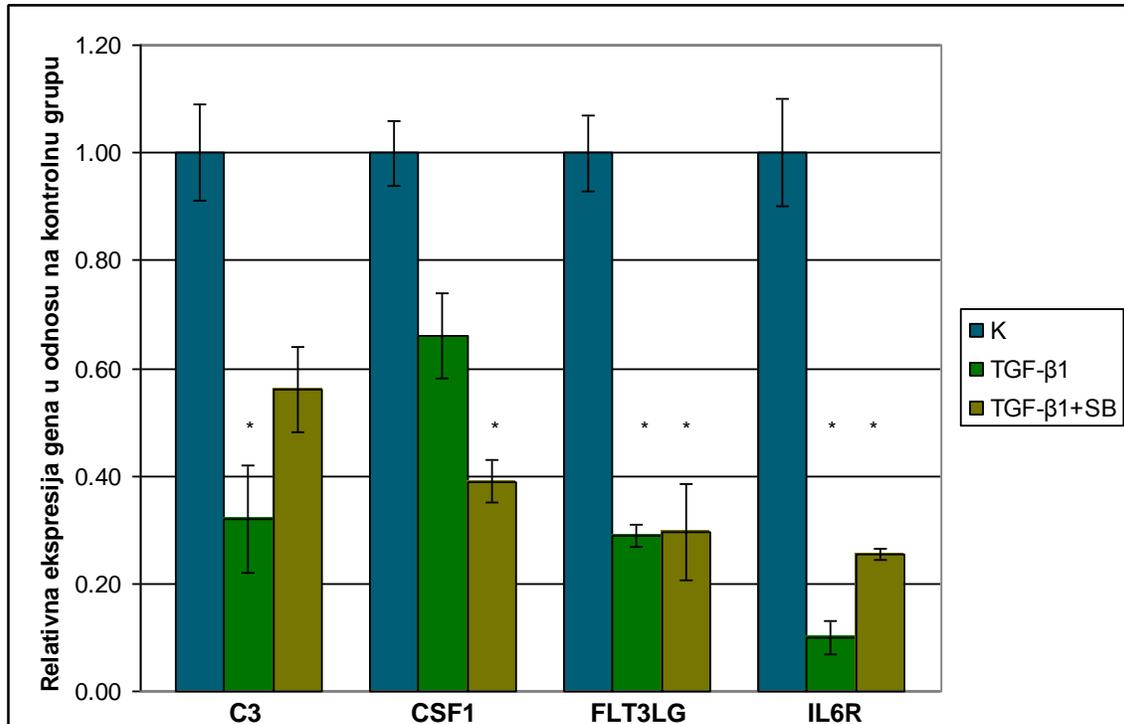
Slika 18. Grafički prikaz distribucije genske ekspresije usporedbom $\log_{10} (\text{TGF-}\beta 1 \ 2^{\Delta} - \text{DeltaCt})$ i $\log_{10} (\text{kontrola } 2^{\Delta} - \text{DeltaCt})$, crveni kružići predstavljaju gene sa povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu, dok zeleni kružići predstavljaju gene sa sniženom ekspresijom u odnosu na kontrolu.



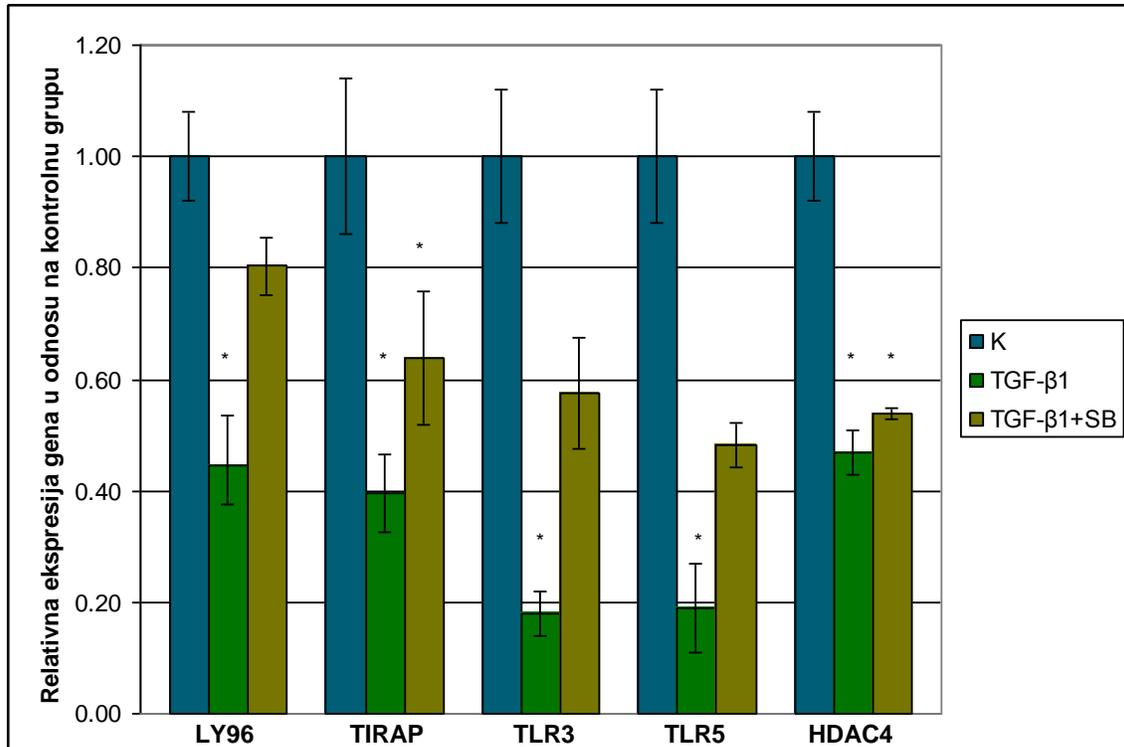
Slika 19. Grafički prikaz distribucije genske ekspresije usporedbom $\log_{10} (\text{TGF-}\beta\text{1+SB } 2^{\Delta} - \text{DeltaCt})$ i $\log_{10} (\text{kontrola } 2^{\Delta} - \text{DeltaCt})$, crveni kružići predstavljaju gene sa povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu, dok zeleni kružići predstavljaju gene sa sniženom ekspresijom u odnosu na kontrolu.



Slika 20. Relativna ekspresija za promijenjene imunološki relevantne gene: kemokin (C-C motiv) 11 (CCL11), kemokin (C-C motiv) 2 (CCL2), interleukin 6 (IL6), pomoćni protein interleukin 1 receptora (IL1RAP). Stanice su tretirane sa citokinom TGF-β1 (3 ng/ml) i zajedno s inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10μM) koji je dodan 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF-β1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i RFLP). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu. * statistički značajna razlika (p<0.05)



Slika 21. Relativna ekspresija moduliranih imunološki relevantnih gena: komponenta komplementa 3 (C3), stimulirajući faktor kolonije 1 (CSF1), ligand fms-slične tirozin kinaze 3 (FLT3G), interleukin 6 receptor (IL6R). Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) i zajedno s inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) koji je dodan 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i RFLP). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu. * statistički značajna razlika ($p < 0.05$)



Slika 22. Relativna ekspresija moduliranih imunološki relevantnih gena: Limfocitni antigen 96 (LY96), Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domena sa adaptor proteinom (TIRAP), Toll-u sličan receptor 3 (TLR3), Toll-u sličan receptor 5 (TLR5), histon deacetilaza 4 (HDAC4). Stanice su tretirane sa citokinom TGF-β (3 ng/ml) i inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10μM) koji je dodan 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF-β1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i RFLP). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu. * statistički značajna razlika ($p < 0.05$)

Tablica 5. Sažeti prikaz promjene ekspresije gena uključenih u upalni i autoimuni odgovor praćene uz pomoć komercijalnog paketa RT² Profiler PCR Array (Human Inflammatory response and Autoimmunity SABiosciences) u stanicama fibroblasta ND: Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) i inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Geni s povećanom ekspresijom su označeni strelicom prema gore (\uparrow) a geni koji su imali sniženu ekspresiju su označeni sa strelicom prema dolje (\downarrow). Statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu označena je zдебљanim slovima.

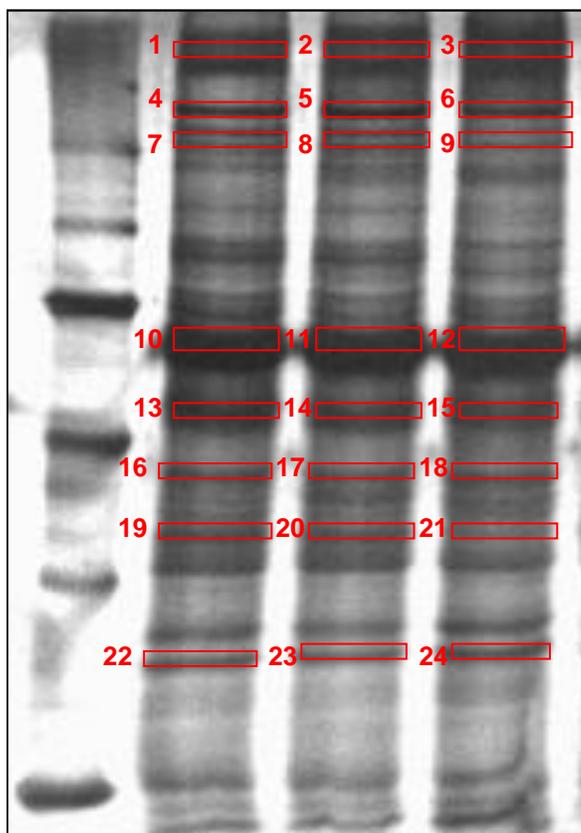
| Gen | Ime gena | TGF- β 1 | | TGF- β 1+SB | |
|--------|---|--------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | | fold change | p vrijednost | fold change | p vrijednost |
| C3 | Komponenta komplementa 3 | \downarrow 0.32 | 0.038 | \downarrow 0.559 | 0.214 |
| C3AR1 | Receptor 1 za komponentu komplementa 3a | \downarrow 0.167 | 0.028 | \downarrow 0.307 | 0.136 |
| CCL11 | Kemokin (C-C motiv) 11 | \uparrow 20.84 | 0.0097 | \uparrow 2.682 | 0.166 |
| CCL2 | Kemokin (C-C motiv) 2 | \uparrow 2.21 | 0.126 | \uparrow 3.63 | 0.0218 |
| CCL7 | Kemokin (C-C motiv) 7 | \uparrow 2.83 | 0.067 | \uparrow 2.40 | 0.317 |
| CD40 | Receptor CD40 | \downarrow 0.27 | 0.112 | \downarrow 0.474 | 0.240 |
| CXCL1 | Kemokin (C-X-C motiv) 1 | \downarrow 0.101 | 0.183 | \downarrow 0.716 | 0.938 |
| CXCL2 | Kemokin (C-X-C motiv) ligand 2 | \downarrow 0.036 | 0.157 | \downarrow 0.095 | 0.191 |
| CXCL3 | Kemokin (C-X-C motiv) ligand 3 | \downarrow 0.292 | 0.222 | \downarrow 0.713 | 0.824 |
| CXCL6 | Kemokin (C-X-C motiv) 6 | \downarrow 0.403 | 0.168 | \downarrow 0.082 | 0.164 |
| FLT3LG | Ligand fms-slične tirozin kinaze 3 | \downarrow 0.289 | 0.0124 | \downarrow 0.296 | 0.0179 |
| IL18 | Interleukin 18 | \downarrow 0.414 | 0.319 | 0.912 | 0.834 |
| IL1RAP | Pomoćni protein interleukin 1 receptora | \uparrow 2.07 | 0.0006 | \uparrow 1.548 | 0.015 |
| IL1RN | antagonist Interleukin 1 receptora | \downarrow 0.476 | 0.247 | \downarrow 0.213 | 0.177 |
| IL6 | Interleukin 6 | \uparrow 7.16 | 0.0370 | \uparrow 4.08 | 0.107 |
| IL6R | Interleukin 6 receptor | \downarrow 0.100 | 0.0112 | \downarrow 0.253 | 0.0239 |

(nastavak na sljedećoj strani)

| | | | | | |
|-------|---|---------|-----------------|---------|---------------|
| LY96 | Limfocitni antigen 96 | ↓ 0.444 | 0.00616 | ↓ 0.802 | 0.204 |
| TIRAP | Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domena sa adaptor proteinom | ↓ 0.395 | 0.000828 | ↓ 0.638 | 0.0283 |
| TLR3 | Toll-u sličan receptor 3 | ↓ 0.180 | 0.0045 | ↓ 0.573 | 0.0741 |
| TLR5 | Toll-u sličan receptor 5 | ↓ 0.190 | 0.0288 | ↓ 0.481 | 0.1216 |
| CCL8 | Kemokin (C-C motiv) 8 | ↓ 0,029 | 0,1615 | ↓ 0,084 | 0.1630 |
| CSF1 | Stimulirajući faktor kolonije 1 | ↓ 0.66 | 0.053 | ↓ 0.39 | 0.011 |
| HDAC4 | Histon deacetilaza 4 | ↓ 0.47 | 0.001 | ↓ 0.54 | 0.015 |

4.5 Rezultati gel elektroforeze 1-DE i masene spektrometrije

Globalna analiza diferencijalne ekspresije sveukupnih proteina iz staničnog medija provedena je uz pomoć metode SDS-PAGE gel-elektroforeze (1-DE). (Slika 23.)



Slika 23. Ogladni gel dobiven razdvajanjem proteina staničnog medija dokumentiran uz pomoć uređaja za slikanje VersaDoc Imaging system (model 4000, BIO-RAD). Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β 1 (3 ng/ml) i s inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanice s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Brojevima obilježena mjesta na gelu predstavljaju linije s proteinima koji su analizirani uz pomoć spektrometrije masa.

Nakon izrezivanja linija s proteinima iz gela te izolacije proteina iz gela provedena je identifikacija uz pomoć masene spektrometrije (MS) pretraživanjem baze podataka (NCBI nr). Rezultati analize sumirani su i prikazani u Tablici 5. Navedeni su oni proteini koji su bili kvalitativno različito eksprimirani u mediju

gdje su rasle tretirane stanice u odnosu na kontrolu dok su pojedini proteini bili prisutni u svim uzorcima. Uspoređene su slijedeće grupe: (1) kontrole, (2) uzorci stanica tretirani s TGF- β 1 (3 ng/ml) te (3) uzorci stanica tretirani s TGF- β 1 (3 ng/mL) i inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1.

Očekivano su identificirani uglavnom proteini izvanstaničnog matriksa koje luče aktivirani fibroblasti tijekom oštećenja i remodeliranja tkiva (Kisseleva i Brenner 2008).

Tablica 6. Proteini eksprimirani u staničnom mediju gdje su rasle stanice ND za grupe: (1) kontrole, (2) uzorci stanica tretirani s TGF- β (3 ng/ml) te (3) uzorci stanica tretirani s TGF- β 1 (3 ng/mL) i inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF β 1 u uvjetima bez seruma. Eksprimirani proteini su izrezani iz gelova te podvrgnuti digestiji uz pomoć tripsina a zatim su identificirani uz pomoć spektrometra masa MALDI-TOF/TOF.

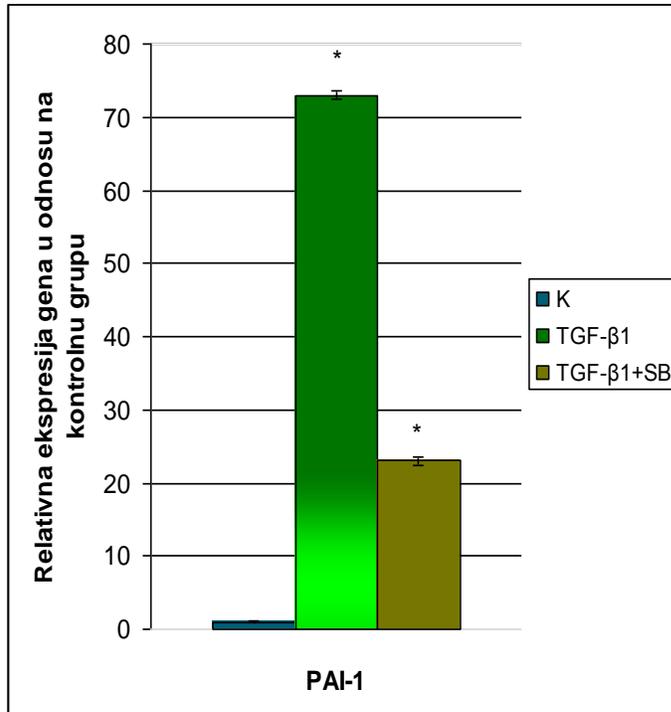
| Broj oznake na gelu | Protein/oznaka gena | Pristupni broj/ncbi | Molekulska masa | Tretman | Područje pouzdanosti identifikacije |
|---------------------|---|---------------------|-----------------|--|-------------------------------------|
| 1,2,3 | Fibronektin 1/FN1 | gi 119590953 | 137642 | Kontrola, TGF β , TGF β + SB | 100 |
| 5 | Pro alfa 1(I) kolagen COL1A2 | gi 186893270 | 138826.6 | TGF β | 100 |
| 8,9 | Kolagen, tip II, alfa 1/COL2A1 | gi 119578373 | 131077.4 | TGF β , TGF β + SB | 100 |
| 11,12 | Matriks metaloproteinaza-2/MMP-2 | gi 5822007 | 70872.2 | TGF β , TGF β + SB | 100 |
| 14,15 | Kolagen alfa-5(VI) lanac COL4A5 | gi 183583553 | 279755.7 | TGF β , TGF β + SB | 100 |
| 16,17 | Matriks metaloproteinaza 1/MMP1 | gi 54697154 | 53947.7 | Kontrola, TGF β | 100 |
| 20,21 | Inhibitor plasminogen aktivatora -1 /PAI-1 | gi 755747 | 143389.2 | TGF β , TGF β + SB | 100 |
| 23 | Tkivni inhibitor matriksmetaloproteinaza 1/TIMP-1 | gi 57210052 | 12526.5 | TGF β | 100 |

4.6 Ekspresija gena ekstracelularnih produkata PAI-1 i TIMP-1

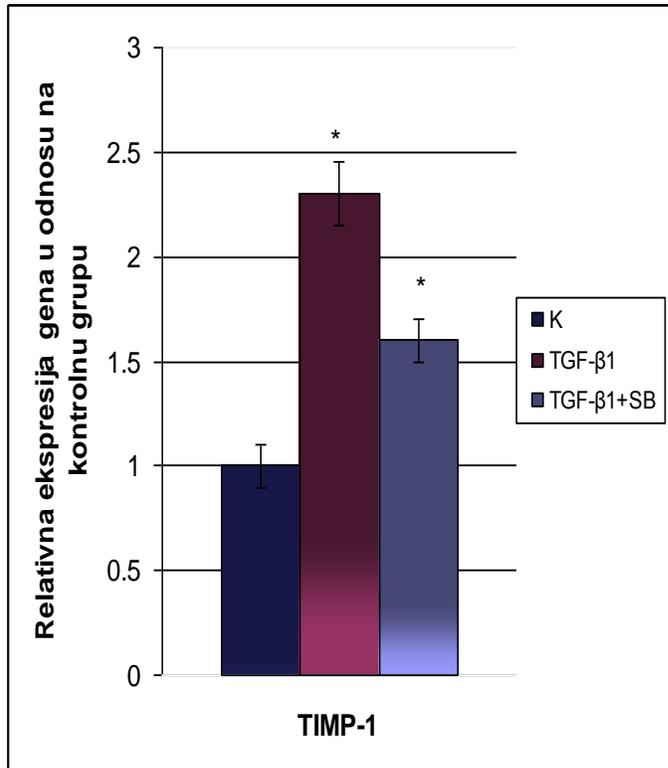
Na temelju analize identificiranih proteina iz staničnog medija u kojem su rasle stanice ND, odabrana su dva proteina za analizu ekspresije gena uz pomoć metode qRT-PCR. Ovime je validirana ekspresija za proteine PAI-1 i TIMP-1.

Inkubacija stanica sa TGF- β 1 (3 ng/mL) dovela je do povećane ekspresije dvaju proteina koji se luče iz stanice u izvanstanični prostor: inhibitora plazminogen aktivatora 1 (PAI-1) za 73 puta i tkivnog inhibitora matriks metaloproteinaza 1 (TIMP-1) za 2.3 puta.

Tretiranje stanica sa inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim na stanice 30 minuta prije stimulacije s TGF- β 1 (3 ng/mL) statistički je značajno umanjio učinak tretmana stanica s TGF- β 1 smanjio ekspresiju inhibitora plazminogen aktivatora 1 za 50 puta. Ekspresija TIMP-1 se smanjila za 0.7 puta.



Slika 24. Relativna ekspresija gena za inhibitor plazminogenog aktivatora-1 (PAI-1) u odnosu na kontrolu. Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) te s kombinacijom TGF- β (3 ng/ml) i inhibitora fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i HPRT). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu. * statistički značajna razlika (p<0.05)



Slika 25. Relativna ekspresija gena za tkivni inhibitor matriks metaloproteinaze-1 (TIMP-1) gena u odnosu na kontrolu. Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) te s kombinacijom TGF- β (3 ng/ml) i inhibitora fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć tri kontrolna gena (S18-rRNA i B2M i HPRT). Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu. * statistički značajna razlika ($p < 0.05$)

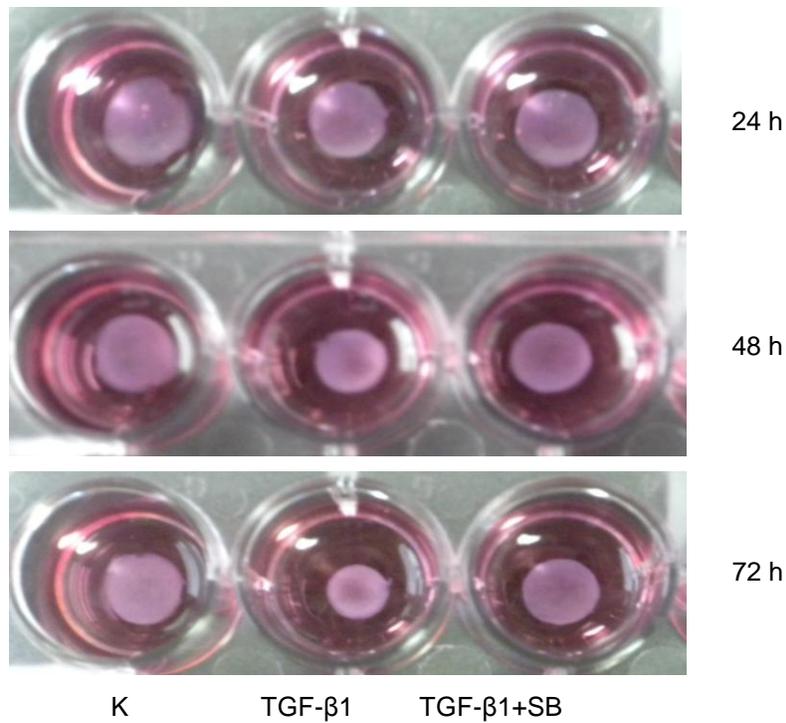
Tablica 7. Promjena u ekspresiji gena za inhibitor plazminogenog aktivatora-1 (PAI-1) i gena za tkivni inhibitor metaloproteinaze-1 (TIMP-1) gena u stanicama ND. Stanice su tretirane sa citokinom TGF- β (3 ng/ml) te s kombinacijom TGF- β (3 ng/ml) i inhibitora fosforilacije p38 SB203580 (10 μ M) dodanim 30 minuta prije stimulacije stanica s TGF- β 1 (3 ng/mL) u uvjetima bez seruma.. Geni s povećanom ekspresijom su označeni sa strijelicom prema gore (\uparrow) a geni sa sniženom su označeni sa strijelicom prema dolje (\downarrow). Statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu je označena zadblijanim slovima.

| Gen | Ime gena | TGF- β 1 | | TGF- β 1+SB | |
|---------------|--------------------------------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | | Status ekspresije | p vrijednost | Status ekspresije | p vrijednost |
| <i>PAI-1</i> | Inhibitor plazminogen aktivatora - 1 | \uparrow 73 | 0.001 | \uparrow 23 | 0.001 |
| <i>TIMP-1</i> | Tkivni inhibitor metaloproteinaza-1 | \uparrow 2.3 | 0.001 | \uparrow 1.6 | 0.001 |

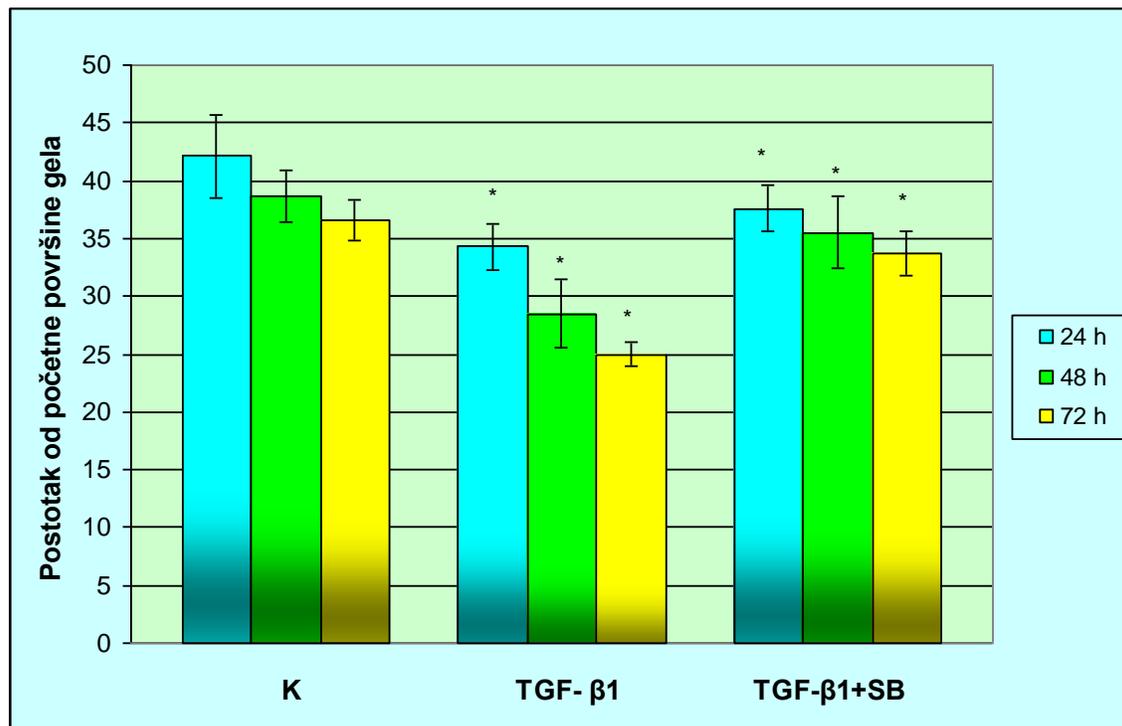
4.7 Određivanje kontrakcije kolagena

U nedostatku animalnog modela za proučavanje uloge TGF- β 1 i inhibitora fosforilacije p38 MAPK kinaze na kontrakciju stanica tijekom diferencijacije fibroblasta u miofibroblaste, korišten je model in vitro s trodimenzionalnom kolagenskom strukturom mišjeg kolagena tipa I u obliku gela. Nakon 24h, 48h i 72h površina gela je slikana te analizirana uz pomoć programa ImageJ. Na temelju dobivenih slika određen stupanj kontrakcije gela. Inkubacija stanica s TGF- β 1 dovela je do značajno povećane kontrakcije kolagenskog gela nakon 24 sata tretmana, smanjivši površinu gela na 34% od početne površine u usporedbi sa kontrolom, koja je smanjena na 42%. Nakon 48h inkubacije s TGF- β 1 površina gela je smanjena na 29% od početne površine dok je u kontroli smanjena na 39%. Inkubacija stanica s TGF- β 1 tijekom 72 sata je smanjila površinu gela na 25% od početne površine za razliku od kontrole gdje je opaženo smanjenje na 37% od početne površine.

Dodatak inhibitora fosforilacije p38 SB203580 pola sata prije tretmana stanica s TGF- β 1 umanjio je djelovanje ovog citokina na kontrakciju kolagena. Tako je nakon 24 sata, površina gela smanjena na 38% od početne površine, nakon 48 sati je smanjena na 36% a nakon 72 sata je smanjena na 34% od početne površine.



Slika 26a.



Slika 26b. TGF-β1 posredovana kontrakcija stanica ND uzgojenih u kolagenom gelu je ovisna o fosforilaciji p38. fStanice ND su uzgojene u neutralnoj otopini kolagena i inkubirane su s TGF-β1 (3 ng/ml) te zajedno s inhibitorom fosforilacije p38 SB203580 (10μM) dodanim 30 minuta prije stimulacije s TGF-β1 (3 ng/mL) tijekom 24, 48 i 72 sata. Gelovi su odvojeni od podloge, a kontrakcije gelova su fotografirane (slika 26a.) i izražene u postocima početne površine gela nakon 24, 48 i 72 sata (slika 27b.). * statistički značajna razlika (p<0.05)

4.8 Polimorfizmi gena za IL-6

Distribucija alela i genotipova za ispitivane genske polimorfizme u genu za IL-6 i učestalost njihovog pojavljivanja u kontrolnih ispitanika i oboljelih od DK je prikazana u Tablici 8. rs1800597 (G/A), Tablici 9. rs1800795 (G/C) i Tablici 10. rs1800796 (G/C). Rezultati su pokazali da nema značajne ($p > 0,05$) razlike u distribuciji genotipova i frekvenciji alela u pojedinom polimorfizmu IL-6 gena između ispitivanih skupina.

Tablica 8. Distribucija alela i genotipova promotorskog polimorfizma rs1800597 gena za IL-6 u oboljelih od DK i kontrolnih ispitanika.

| IL6 rs1800597 | pacijenti | | kontrola | |
|--|-----------|-------------|----------|-------------|
| | N | % | N | % |
| GG | 12 | 27 | 22 | 48 |
| GA | 23 | 52 | 14 | 30 |
| AA | 9 | 21 | 10 | 22 |
| $\chi^2=5,141$; $df=2$; $p=0,0765$; $OR=2,44$ (1,01-5,89) | | | | |
| alel | N | frekvencija | N | frekvencija |
| G | 47 | 0,46 | 58 | 0,63 |
| A | 41 | 0,53 | 34 | 0,37 |
| $\chi^2=1,718$; $df=1$; $p=0,19$; $OR=1,48$ (0,82-2,69) | | | | |

Tablica 9. Distribucija alela i genotipova promotorskog polimorfizma rs1800795 gena za IL-6 u oboljelih od DK i kontrolnih ispitanika.

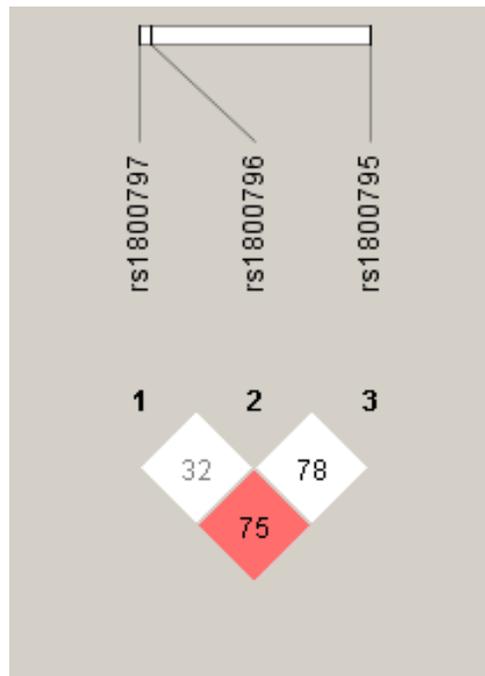
| IL6 rs1800795 | pacijenti | | kontrola | |
|---|-----------|-------------|----------|-------------|
| | N | % | N | % |
| genotip | | | | |
| GG | 12 | 27 | 21 | 45 |
| GC | 23 | 52 | 15 | 33 |
| CC | 9 | 21 | 10 | 22 |
| $\chi^2=4.149$; $df=2$; $p=0,125$; $OR=2,24$ (0,92-5,40) | | | | |
| alel | N | frekvencija | N | frekvencija |
| G | 47 | 0,46 | 57 | 0,62 |
| C | 41 | 0,53 | 35 | 0,38 |
| $\chi^2=1.347$; $df=1$; $p=0,245$; $OR=1,42$ (0,78-2,57) | | | | |

Tablica 10. Distribucija alela i genotipova promotorskog polimorfizma rs1800796 gena za IL-6 u oboljelih od DK i kontrolnih ispitanika .

| IL6 rs1800796 | pacijenti | | kontrola | |
|--|-----------|-------------|----------|-------------|
| | N | % | N | % |
| genotip | | | | |
| GG | 38 | 86 | 37 | 80 |
| GC | 6 | 14 | 9 | 20 |
| CC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $\chi^2=0.569$; $df=1$; $p=0,450$ $OD=0.649$ (0,21-2,00) | | | | |
| alel | N | frekvencija | N | frekvencija |
| G | 82 | 0,93 | 83 | 0,90 |
| C | 6 | 0,07 | 9 | 0,1 |
| $\chi^2=0,5174$; $p=0,47$; $OD=0,67$ (0,22-1,98) | | | | |

4.8.1 Analiza haplotipskog bloka polimorfizama rs1800597, rs1800795 i rs1800796

U analizu za određivanje strukture haplotipskog bloka unutar promotorske regije IL-6 su uključena sva tri polimorfizma (rs1800597, rs1800795, rs1800796). Program Haploview version 4.2 korišten je za izradu LD matrice i utvrđivanje haplotipskog bloka za sva tri polimorfizma. Zabilježen je visok stupanj neravnoteže udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*, LD) upućujući na veliku vjerojatnost (75%) da se polimorfizmi rs1800597 i rs1800795 nasljeđuju zajedno u bloku (slika 27.). Također su izračunate i frekvencije najčešćih haplotipova za navedene polimorfizme te se pokazalo da je frekvencija haplotipa AGG značajno različita između kontrolne skupine i pacijenata oboljelih od DK.



Slika 27. Prikaz vrijednosti LD-a između SNP-a za rs1800597, rs1800795 i rs1800796 dobiven pomoću programa Haploview version 4.2 u cijelom ispitivanom uzorku.

Tablica 11. Frekvencije haplotipova za polimorfizme rs1800597, rs1800795 i rs1800796 unutar skupina kontrolnih ispitanika i pacijenata oboljelih od DK, dobiveni u programu Haploview version 4.2

| HAPLOTIPOVI | FREKVENCIJA HAPLOTIPOVA | χ^2 | FREKVENCIJA HAPLOTIPOVA PACIJENTI/KONTROLA | <i>p</i> |
|-------------|-------------------------|----------|--|----------|
| GGG | 0.454 | 2.515 | 0.394, 0.512 | 0.1127 |
| AGC | 0.343 | 0.99 | 0.379, 0.309 | 0.3197 |
| GGC | 0.064 | 1.043 | 0.084, 0.046 | 0.307 |
| GCG | 0.070 | 0.498 | 0.056, 0.083 | 0.4802 |
| AGG | 0.044 | 4.06 | 0.075, 0.014 | 0.0439 |
| ACG | 0.015 | 0.506 | 0.009, 0.022 | 0.4769 |

5. Rasprava

Dupuytrenova bolest (Dupuytrenova kontraktura, DK) je čvorasta palmarna fibromatoza koja uzrokuje savijanje prstiju te u konačnici dovodi do trajnog gubitka funkcije šake. Liječenje DK još uvijek se temelji na kirurškom odstranjivanju oboljelog tkiva. Međutim, i dalje se bilježi velika stopa recidiva čak do 77% (Werker i sur. 2012). Jedan vid terapije u ranijim fazama bolesti su injekcije koalgenaza u oboljelo područje iako se niti ovaj pristup nije pokazao dovoljno učinkovit. Stoga se istražuju i drugi alternativni, prije svega neoperativni načini liječenja uključujući one koji ciljaju molekularne procese uključene u proliferaciju i diferencijaciju fibroblasta.

Kompleksna molekularna pozadina DK otežava definiranje novih vidova terapije, osobito one ciljane. Tomu je razlog što su u razvoj bolesti uključeni složeni biološki i stanični procesi poput različitih signalnih kaskada u stanicama i interakcija molekula. Donedavno su istraživanja DK bila usmjerena na proučavanje pojedinačnih čimbenika ili procesa koji pridonose patogenezi ove bolesti (Badalamente i sur. 1996, Bayat i Watson 2003, Augoff i sur 2005) i stoga nisu mogli osigurati sveobuhvatno razumijevanje signalnih putova unutar stanica niti otkriti njihov redoslijed događanja tijekom patogeneze. Globalni pristup proučavanju DK temeljen na korištenju metoda funkcionalne genomike koji je aktualan zadnjih godina stoga može ponuditi odgovor na niz otvorenih pitanja. Funkcionalna genomika kao disciplina temelji se na sistemskoj identifikaciji bioloških putova i procesa kako u normalnim, kontrolnim uzorcima tako i u bolesnim uzorcima, pri čemu se koriste statistička i bioinformatička analiza dobivenih rezultata (Sedic i sur. 2010). Stoga smo u ovom radu uz pomoć modernih globalnih metoda (čip analiza, qRT-PCR i proteomika) pokušali razjasniti mehanizme nastanka i razvoja DK.

Kako bi se proučili mehanizmi koji sudjeluju u aktivaciji fibroblasta i njihovoj diferencijaciji u miofibroblaste, uzgojeni su fibroblasti izolirani iz histološki zdravog i bolešću nezahvaćenog tkiva fascije dlana pacijenata oboljelih od DK kod kojih je za potrebe istraživanja inducirana diferencijacija uz pomoć transformirajućeg čimbenika rasta 1 (TGF- β 1) sa ili bez dodatka inhibitora p38 MAPK. Naime, diferencijacija fibroblasta u miofibroblaste je ključni proces DK za

kojeg smo prethodno pokazali kako je induciran putem aktivacije kinaze p38 (Ratkaj i sur. 2012). U ovoj disertaciji su dobiveni rezultati potvrdili kako je inhibitor p38 MAPK (SB203580) uspješno inhibirao kinazu p38 u stanicama tijekom tretmana sa TGF- β 1. Nadalje, kinaza p38 bila je aktivna i u kontrolnim stanicama kožnih fibroblasta što navodi na zaključak da je on možda važan i za održavanje homeostaze fibroblasta palmarne fascije ili pak da se u njima već odvijaju molekularne promjene koje pridonose razvoju bolesti.

Primarne stanične kulture mogu se uspješno koristiti kao model za istraživanje učinka različitih čimbenika rasta, citokina, kemokina i inhibitora signalnih putova u uvjetima *in vitro*. Dobivaju se iz tkiva ili organa klasičnim metodama uzgoja stanica u uvjetima *in vitro*. Često se u početku, primarne kulture sastoje od različitih vrsta stanica ali s obzirom da se neke od stanica dalje ne dijele, gube se u rastućoj populaciji onih stanica koje imaju sposobnost diobe u uvjetima *in vitro*. Uzgoj primarnih kultura zahtijevan je posao, a takve stanice se mogu održavati u uvjetima *in vitro* samo kroz određeni vremenski period. Njihova je glavna prednost ta što zadržavaju mnoge od ishodišnih karakteristika stanica *in vivo* (Terry i sur. 1995)

Jedan od često korištenih modela primarnih staničnih kultura su fibroblasti čovjeka, primjerice oni porijeklom iz kože. Tako se uzgojeni fibroblasti u kulturi mogu presađivati ograničeno do 46 puta. Klasične metode uzgoja primarnih kultura fibroblasta su se pokazale vrlo uspješne za uzgoj fibroblasta i miofibroblasta. Tijekom naših prethodnih istraživanja uspješno smo uzgojili primarne stanice iz tkiva fascije dlana oboljelih od DK (Kraljevic Pavelic i sur. 2009). Dokazali smo kako stanice iz oboljelog dijela fascije dlana brže proliferiraju od stanica iz bolešću nezahvaćenog dijela fascije. Nadalje smo pokazali kako se miofibroblasti u velikom broju nalaze u primarnim kulturama stanica uzgojenim iz čvorova Dupuytrenove kontraktura te u manjoj mjeri u stanicama uzgojenim iz nezahvaćenog dijela fascije (Kraljevic Pavelic i sur. 2009, Ratkaj i sur. 2012). Postojanje miofibroblasta u kulturi stanica uzgojenim iz bolešću nezahvaćene fascije (u daljnjem tekstu stanice ND) ukazuje da su miofibroblasti vjerojatno izvor recidiva bolesti nakon operativnog zahvata. Jemec

i sur. su (Jemec i sur. 1999) slično pokazali da ispoljavanje markera miofibroblasta α -glatkog mišićnog aktina raste u stanicama uzgojenim iz nezahvaćenog dijela fascije sa porastom gustoće stanica u kulturi što je vrlo slično stanju proliferativne faze DK. Stoga su upravo primarne stanične kulture iz bolešću nezahvaćenog (priležećeg) tkiva palmarne fascije oboljelih od DK odabrane kao prikladni model za istraživanje mehanizama nastanka i razvoja DK.

Brojna istraživanja su pokazala da je aktivacija fibroblasta putem TGF- β 1 i nekih drugih citokina, najvažniji mehanizam u nastanku i razvoju fibroproliferativnih bolesti (Tomasek i sur. 2002). Kod Dupuytrenove bolesti, kao i kod ostalih fibroproliferativnih bolesti TGF- β 1 ima ključnu ulogu jer pokreće snažnu signalnu kaskadu koja vodi u proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu i uzrokuje promjene u strukturi izvanstaničnog matriksa. Ovi procesi započinju vezanjem liganda TGF- β 1 za receptor T β R2, nakon čega receptor T β R2 vrši fosforilaciju receptora T β R1. Receptor T β R1 odgovoran je za fosforilaciju proteina Smad i daljnji prijenos signala koji rezultira citoskeletnim promjenama (Massague 1998). Citokin TGF- β 1 regulira dinamiku citoskeleta preko signalnog puta ovisnog o Smad (Piek i sur. 1999) te aktivacijom kinaza Rho (Bhowmick i sur. 2001) i p38 (Edlund i sur. 2002). Dokazano je da inhibicija kinaze p38 i signalnog puta MAPK umanjuje plućnu i bubrežnu fibrozu u animalnim modelima (Matsuoka 2002, Sugiyama 2010). Osobito je u signalnom putu MAPK zanimljiva serin/treonin mitogen aktivirana protein kinaza (MAPK) - aktivirana protein kinaza-2 (MAPKAPK2 ili MK2) koja zajedno s kinazom MK3 predstavlja glavnu nizvodnu metu za p38. MK2 ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, preslagivanju aktina, razvoju stanice, migraciji i proizvodnji citokina/kemokina (Gaestel i sur. 2006). Također je na miševima dokazano da MK2 sudjeluje u diferencijaciji fibroblasta u miofibroblaste tijekom razvoja plućne fibroze (Liu 2007). Studija Thuraisingame i sur. (Thuraisingame i sur. 2010), je pokazala kako MK2 sudjeluje u procesu zacjeljivanja rane kod miševa. Naša nedavna transkriptomaska istraživanja su identificirala pojačanu ekspresiju za tri gena u miofibroblastima izoliranim iz bolešću zahvaćenog tkiva iz oboljelih od DK,

THBS1, GADD45 β i NUA1 čija je ekspresija pod kontrolom signalnog puta p38 MAPK, a koji su ključni za proliferaciju stanice i stvaranje izvanstaničnih proteina (Ratkaj i sur 2012).

Dobiveni rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji nadovezuju se na prethodna istraživanja. Tako su geni čija je ekspresija određena metodom qRT-PCR nakon tretmana s TGF- β 1 sa/bez inhibitora kinaze p38 regulatori procesa izgradnje izvanstaničnog matriksa, citoskeleta ili pak kodiraju za membranske proteine (vidi tablicu 4). Dobiveni rezultati stoga pokazuju da TGF- β 1 ima značajnu ulogu u aktivaciji i diferencijaciji fibroblasta u miofibroblaste što se dobro vidjelo povećanjem razine genske ekspresije alfa glatkog mišićnog aktina (α -SMA) i paladina koji su glavni markeri za miofibroblaste. Poznato je kako aktinski citoskelet ima bitnu ulogu u regulaciji staničnih procesa poput primjerice procesa proliferacije, apoptoze, migracije stanica i metastaziranja (Jaffe i sur. 2002). Nadalje, aktinski citoskelet pod utjecajem vanjskih signala dovodi do promjena oblika stanica i adhezije što uzrokuje njihovu migraciju. Ova su svojstva stanica neophodna za zarastanje rana. Prilikom oštećenja tkiva najprije dolazi do lučenja citokina koji uzrokuju citoskeletne promjene i stimuliraju migraciju fibroblasta u ranjeno područje. Fibroblasti potom sintetiziraju proteine izvanstaničnog matriksa (engl. *ekstracellular matrix*, ECM), poput kolagena, čime ECM postupno zamjenjuje oštećeno tkivo, a daljnje promjene u citoskeletu dovode do kontrakcije unutar ranjenog područja i zatvaranja rane (Cowin i sur. 2006). Važno je stoga naglasiti kako je dobro poznato da elementi patogeneze DK ali i ostalih fibroza u velikoj mjeri nalikuju procesima zarastanja rana: prije svega se to odnosi na lučenje profibrogenih citokina poput TGF- β 1 i nastanak karakterističnih promjena u sastavu izvanstaničnog matriksa koji biva građen od heteropolisaharida i fibroznih proteina poput kolagena, elastina, laminina i fibronektina (Kanappe i sur. 2010). Nadalje dolazi do promijene fenotipa fibroblasta koji diferenciraju u miofibroblaste što se može pratiti povećanjem ekspresije glatkog mišićnog aktina α (engl. *smooth muscle actine*, α SMA) i proteina paladina što dovodi do reorganizacije aktinskog citoskeleta i stvaranje debljih snopova aktina (Parast i Otey 2000, Boukhelifa i sur. 2003, Rachlin i Otey

2006). Ovi su markeri dokazani u korištenom staničnom modelu na razini ekspresije gena odmah nakon indukcije diferencijacije uz pomoć TGF- β 1 te na razini ekspresije proteina u istraživanju koje je prethodilo izradi ove doktorske disertacije (Ratkaj i sur. 2012).

Nadalje, osim markera miofibroblasta TGF- β 1 je u primarnim stanicama ND inducirao čitav niz gena koji su uključeni u promijenu fenotipa fibroblasta i njihovu diferencijaciju u miofibroblaste (Tablica 4). Trombospondin 1 (THBS1) je pri tome pokazao najveću relativnu promjenu u ekspresiji od čak 12.1 puta što je u skladu s literaturnim podacima koji pokazuju da citokin TGF- β 1 pozitivno utječe na ekspresiju gena THBS1 preko aktivacije kinaze p38, Smad-neovisnim putem (Okamoto i sur. 2001). Osim aktivacije latentnog oblika citokina TGF- β 1 (Ullrich i sur. 2000), THBS1 sudjeluje u signalnim interakcijama odgovornim za kontrakciju i proliferaciju stanica te u sintezi izvanstaničnog matriksa. Njegova ugradnja u fibrilarne strukture izvanstaničnog matriksa ovisi o polimerizaciji fibronektina. Kontinuirana je polimerizacija fibronektina stoga nužna za organizaciju i održavanje stabilnosti izvanstaničnog matriksa i adheziju stanica (Sottile i sur. 2002). Naši rezultati naime, pokazuju i povećanu ekspresiju fibronektina 1 (FN1) koji je pojačano eksprimiran u palmarnoj fasciji kod pacijenata koji boluju od DK (Howard i sur. 2004). Pri tome smo zabilježili značajno povećanu ekspresiju izoforme fibronektina ED-A, dok je razina ekspresije ukupnog fibronektina i njegove izoforme ED-B bila nešto niža od izoforme ED-A. Upravo se izoforma fibronektina ED-A pojavljuje za vrijeme proliferativne faze bolesti, a njezina se količina smanjuje u rezidualnoj fazi bolesti. Izoforma ED-B i *de novo* glikozilirani fibronektin su također zastupljeni tijekom proliferativne faze bolesti. Funkcija ovih izoformi još nije u potpunosti razjašnjena. Studija rađena na *knock out* ED-A miševima je pokazala važnost izoforme ED-A za nastanak i razvoj plućne fibroze. Histološkom analizom je utvrđeno da *knock out* miševi u usporedbi sa divljim tipom miševa imaju značajno smanjen broj fibroblasta koji eksprimiraju α -SMA kao i manje kolagena u ECM. Osim toga zamijećena je i smanjena aktivacija latentnog oblika TGF- β 1 kao i smanjena aktivacija fibroblasta tretmanom s TGF- β *in vitro* (Muro i sur. 2007). Povećano izlučivanje fibronektina u čvorove oboljelih

od Dupuytrenove kontrakture povezano je s njegovim nakupljanjem na površini miofibroblasta gdje sudjeluje u stvaranju fibroneksusa. Fibroneksus je građevni element, putem kojeg se sila stezanja uzrokovana aktinskim mikrofilamentima, prenosi u obližnji izvanstanični matriks i tkivo, a služi i kao platforma za prijenos signalnih putova unutar stanice. Nakon što smo stanice tretirali s inhibitorom kinaze p38 smanjila se i količina ukupnog fibronektina i njegove dvije izoforme (ED-A i ED-B). Nadalje, fragmenti koji nastaju proteolitičkim djelovanjem THBS1 potiču migraciju endotelnih stanica putem aktivacije kinaze p38 i kinaze Erk1/2 koje reguliraju ekspresiju gena MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 (Borstein i sur. 2001, Donnini i sur. 2004). Poznato je također, kako membranski kompleks THBS1 i kalretikulina aktivira signalnu kaskadu kinaze Akt putem interakcija s proteinom G i fosfatidilinozitol 3 kinazom (PI3K) te pridonosi razvoju fibroze (Greenwood i sur. 1998, Goicoechea i sur. 2000, Sweetwyne i sur. 2010) što je u skladu s našim prethodno objavljenim rezultatima (Kraljević Pavelić i sur. 2009).

Poznato je kako je jedna od glavnih karakteristika DK prekomjerno nakupljanje i sinteza kolagena u čvorovima palmarne fascije, osobito kolagena I i III. Osim toga, tijekom razvoja same bolesti dolazi do promjene u vrsti ispoljenog kolagena, pa tako oboljela fascija sadrži veću količinu kolagena III u odnosu na kolagen I. Ovakvi procesi u stanicama se izravno manifestiraju u izvanstaničnom matriksu što uzrokuje stalno povećavanje kontraktilne sile zbog koje se savijaju prsti te gubi funkcija šake. Dokazano je da TGF- β 1 snažno potiče ekspresiju kolagena I u stanicama izoliranim iz oboljele fascije (čvorova) oboljelih od DK (Chen i sur. 1999) dok je kod nekih fibroza ekspresija gena kolagena III povećana djelovanjem PDGF-a (Bonner 2004). U skladu s ovim podacima utvrdili smo povećanu razinu ekspresije kolagena I α 1 naon tretmana stanica s TGF- β 1, dok je njegova razina bila tek neznatno smanjena u tretmanu istih stanica s inhibitorom kinaze p38. Razina ekspresije prokolagena III α nije se statistički značajno povećala u tretmanima. Zanimljivo je kako smo prethodno dobivene proteomske rezultate (Kraljević Pavelić i sur. 2009) potvrdili i na razini gena. Naime, tretman stanica s TGF- β 1 je inducirao ekspresiju gena za receptor inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGFR-1). Inače IGF-1 čimbenik rasta je jedan

od najsnažnijih mitogena, stoga povećanje u ekspresiji njegovog receptora djelovanjem TGF- β 1 vjerojatno dodatno potiče proliferaciju fibroblasta/miofibroblasta tijekom ranih faza razvoja bolesti. Na razini gena potvrdili smo i povećanu razinu proteina ARHGDI koji je pojačano eksprimiran u fasciji oboljelih od DK (Kraljević Pavelić i sur. 2009), a koji pripada obitelji proteina RhoGDI koji reguliraju male GTPaze Rho te na taj način kontroliraju aktinski citoskelet, staničnu diobu, migraciju, morfologiju, vezikularni transport, stvaranje fokalnih adhezija i ekspresiju gena (Harding i Theodorescu 2010). Iz navedenoga se jasno može zaključiti kako se fibroproliferativni proces DK induciran s TGF- β 1 može dobro pratiti analizom ekspresije seta gena koji induciraju fibrozne promjene u fibroblastima.

Međutim, dobiveni rezultati pokazuju kako se osim fibroproliferativnih promjena u stanicama oboljelih od DK odvija i niz upalnih reakcija što ne čudi s obzirom da su proliferativno oboljenje i upala dva međusobno povezana stanja sa velikim brojem mehanizama koji se preklapaju. Primjerice, zarastanje rana koje uključuje oba ova mehanizma, započinje sa upalnim odgovorom i normalno završava promjenom strukture tkiva i zalječenjem. Važnu ulogu pri tome imaju citokini/kemokini koji su stimulatori, inhibitori i prijenosnici signala tijekom različitih bioloških procesa. Prilikom oštećenja tkiva i zacjeljivanja najprije se aktiviraju imunološki mehanizmi u okolnom tkivu što dovodi do nakupljanja leukocita u oštećenom području. Polimorfni neutrofili i monociti-makrofazi su leukociti koji pristižu u oštećeno područje zahvaljujući koncentracijskom gradijentu raznih kemokina. Fibroblasti kao stanice vezivnog tkiva odgovorni su za sintezu brojnih sastojaka ECM s kojim su fizički povezani. Danas sve veći broj istraživanja potvrđuje kako fibroblasti nisu pasivni elementi u upalnom procesu već da imaju sposobnost transformacije fenotipa koji potom promovira upalnu reakciju izlučivanjem kemokina, citokina, faktora rasta i ostalih molekula za imunološku obranu u uvjetima kao što su fibroza, popravak oštećenog tkiva ili tumorigeneza. Stoga se fibroblasti smatraju sastavnim dijelom prirođenog imunološkog sustava jer sadrže određene funkcije i receptore svojstvene makrofazima. Upravo zahvaljujući tim karakteristikama, oni posjeduju sposobnost

aktivnog poticanja upalnog odgovora i pojačavaju fibrozne procese. Normalna akutna upala prestaje čim se završi proces zacjeljivanja i popravka oštećenog tkiva. Ponekad se kronična upala nastavlja i može doći do oštećenja okolnog tkiva i nastanka fibroze. Smatra se da fibroblasti u tom prijelazu imaju važnu ulogu jer održavaju razinu signala za imunološku aktivnost i preživljavanje leukocita. DK je sigurno jednim dijelom posljedica poremećenog imunološkog odgovora zbog prodora imunoloških stanica u čvorove tijekom ranog stadija razvoja bolesti gdje se potom izlučuju velike količine različitih citokina, kemokina i čimbenika rasta, osobito TGF- β 1 koji regulira aktivnost fibroblasta. Sve je veći broj istraživanja koja potvrđuju autokrine i parakrine mehanizme regulacije razine TGF- β 1 i citokina/kemokina putem nekoliko signalnih putova unutar stanice, a jedan od najvažnijih signalnih putova pri tome je p38 MAPK. U ovom radu je stoga istražen učinak TGF- β 1 na aktivaciju signalnog puta p38 MAPK u primarnim stanicama pacijenata s DK te posljedičnu aktivaciju gena uključenih u upalni i autoimuni odgovor. Dobiveni rezultati pokazuju kako je TGF- β 1 uzrokovao promjenu ekspresije 16 gena od ukupno istraženih 84 gena. Gen s najvećim povećanjem ekspresije nakon tretmana s TGF- β 1 bio je kemokin 11 (CCL11). Njegova je razina ekspresije bila stabilna i nakon inhibicije aktivnosti kinaze p38. Poznato je kako kemokin CCL11 (eotaksin-1) selektivno utječe na proliferaciju keratinocita, plućnih i bronhijalnih fibroblasta, povećanje ekspresije matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) i sintezu kolagena tipa I ali ne i na njihovu kontrakciju, diferencijaciju i otpuštanje TGF- β 1. Nadalje, CCL11 potiče migraciju plućnih fibroblasta (Puxeddu i sur. 2006). Navedeni rezultati upućuju na to da CCL11 djeluje u početnoj fazi promjene fenotipa fibroblasta i da su drugi faktori poput TGF- β 1 potrebni za daljnji razvoj bolesti. Nadalje CCL11 može potaknuti migraciju progenitorskih mastocita u upalno područje unutar tkiva i aktivirati mastocite koji potom uzrokuju fibrozu (Price i sur. 2003). Naime u tkivu DK je primijećena povećana količina mastocita, stoga je moguće da i oni putem CCL11 aktivno sudjeluju u mehanizmima nastanka DK (Schubert 2006). Huaux i sur. su dokazali kako CCL11 ima i pro-angiogeni učinak, što je popratna pojava svih fibroproliferativnih bolesti (Huaux i sur. 2005). Wenzel i sur. (Wenzel i sur. 2002)

su nadalje pokazali da limfociti i makrofazi privučeni u upalno područje izlučuju TGF- β 1, IL4 i IL13 koji djeluju na otpuštanje CCL11 iz fibroblasta. Na taj način potiču se promijene u ECM što ukazuje da je djelovanje citokina/kemokina i čimbenika rasta usko povezano i da među njima postoje složene interakcije. Važnost CCL11 u nastanku fibroza vidljiva je kod miševa CCL11 -/- koji razvijaju značajno blaži oblik fibroze, a ujedno imaju sniženu razinu TGF β 1. Osim toga, povećana količina CCL11 snažno pojačava bleomicinom potaknutu plućnu fibrozu i stvaranje profibroznih citokina TGF- β 1 i CCL2, kao i migraciju neutrofila i eozinofila u oštećeno područje (Huaux i sur. 2005). Postoji veliki broj radova koji opisuju postojanje rezervoara za kemokin CCL11 unutar fibroblasta te da postoji autokrini regulacija fibroznih procesa putem kemokina CCL11 (Huber i sur. 2000, Hogaboam i sur. 1998). Ekspresija CCL11 može se primjerice povećati djelovanjem TNF- α , TGF- β , IL-4, i IL13 (Atasoy i sur. 2004, Teran i sur. 1999, Wenzel i sur. 2002, Langdon i sur. 2003). Stoga je vjerojatno kako citokini uključeni u fibrozu, mogu pored njihove izravne profibrozne funkcije mijenjati ekspresiju gena CCL11 što u konačnici može pojačati fibrozni proces, povećanjem dotoka granulocita. Zanimljivo je kako su naši rezultati pokazali povećanu ekspresiju gena interleukin 6 (IL6) slično kao što su pokazali (Bunker i sur. 2000). IL-6 je profibrozni citokin i njegova ekspresija je u korelaciji s različitim fibroznim oboljenjima. Dokazano je da smanjuje ili povećava proliferaciju fibroblasta, povećava sintezu kolagena, glikozaminoglikana, sintezu tkivnog inhibitora matriksmetaloproteinaza-1 (TIMP-1), kemokina CCL2 (MCP-1) i IL-6 (Mihara i sur. 1996, Duncan i sur. 1991, Sporri i sur. 1999, Miharra i sur. 1995, Irwin i sur. 2002). IL-6 također regulira i ekspresiju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) važnog posrednika između angiogeneze i fibroze (Cohen i sur. 1996). Apoptoza miofibroblasta je ključna u procesu nestanka fibroze. Utvrđeno je da IL-6 uzrokuje apoptozu zdravih plućnih stanica, dok na fibroblaste iz plućne fibroze ima suprotan učinak (Moodley i sur. 2004) te na taj način onemogućava pravovremenu apoptozu miofibroblasta. Seong i sur. su dokazali da TGF- β 1 potiče ekspresiju IL-6 (Seong i sur. 2009). Utišavanje IL-6 gena uz pomoć siRNAs značajno smanjuje ekspresiju α -glatkog mišićnog aktina

(α -SMA) u fibroblastima izoliranih iz fascie bulbi. Naši rezultati ukazuju da postoji autokrina regulacija fibroblasta i njihove diferencijacije putem citokina IL-6. Zanimljivo je da velika većina stanica uključujući fibroblaste ne sadrži receptor za IL-6. Stanice koje sadrže samo gp130 a ne i IL6 receptor ne mogu biti aktivirane s IL-6. Međutim, moguće je da proteolizom dolazi do oslobađanja receptora za IL-6 sa površine stanica koje ga sadrže pri čemu prelazi u otopljeni oblik koji također može vezati ligand. Ukoliko dođe do vezivanja liganda i receptora na površini stanice za gp130 dolazi do aktivacije stanice, a opisani proces se naziva trans-signalizacija (Scheller i sur. 2006). S obzirom na dobiveni rezultat zanimalo nas je da li je povećana količina IL-6 posljedica genetske predispozicije oboljelih od DK ili samo jedan glasnik u fibroproliferativnom procesu koji se odvija kod DK. U tu smo svrhu analizirali dobro definirane polimorfizme u promotoru gena za IL-6. Najčešće istraživani polimorfizam gena IL-6 unutar promotora je -174G/C. Studije pokazuju da je ekspresija -174 G alela kod bijelaca za 60% veća od alela -174 C te da je njegova ekspresija puno osjetljivija na djelovanje IL-1 i endotoksina. Ovaj polimorfizam određuje stoga dva fenotipa: (1) transkripcijski vrlo aktivan određen genotipom -174G/C i -174G/G za koje je utvrđena povećana količina IL-6 u serumu i (2) transkripcijski manje aktivan fenotip predstavljen s genotipom -174C/C (Fishman i sur. 1998). Drugi značajan polimorfizam u promotorskoj regiji je -597 G/A. Genotipovi G/G i G/A su povezani s povećanom ekspresijom IL-6 za razliku od genotipa A/A. Za polimorfizme u promotoru IL-6 -174 G>C i -597 G>A je utvrđeno da su povezani s nastankom nekoliko bolesti (de-Madaria i sur. 2008, Gordon i sur. 2008). Također, frekvencija alela A je veća unutar populacije bijelaca u odnosu na ostale populacije. Između ova dva navedena polimorfizma postoji jaka neravnoteža prijenosa (engl. *linkage disequilibrium*), što znači da se zajedno nasljeđuju. Treći polimorfizam u promotorskoj regiji je -572 G/C. Alel C kod ovog polimorfizma je povezan s povećanom ekspresijom IL-1 β i TNF- α (Cozen i sur. 2006). Uz pomoć metode RT-PCR ustanovili smo kako nema razlike u distribuciji alela i genotipova -174G/C, -572 G/C i -597 G/A polimorfizma IL-6 gena između oboljelih od DK i kontrolne skupine. Stoga se na temelju rezultata ne može dokazati povezanost

polimorfizama u promotoru za IL-6 s nastankom DK. Utvrđen je visok stupanj neravnoteže udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*, LD) u promotorskim polimorfizmima za IL-6 (rs1800597 i rs1800795) što je u skladu sa literaturnim podacima (Terry i sur. 2000). Osim toga, rezultati su potvrdili da je frekvencija haplotipa AGG značajno različita između kontrolne skupine i pacijenata oboljelih od DK. Iako svaki SNP u promotorskoj regiji zasebno sudjeluje u reguliranju razine IL-6, njihov pojedinačni učinak nije nezavisan od drugih SNP-ova (Terry i sur. 2000). Stoga je moguće da jedinke (osobe) sa AGG haplotipom imaju veću sklonost za razvoj Dupuytrenove kontraktуре koja možda može biti u korelaciji sa povećanom ekspresijom IL-6.

Tretman s TGF- β 1 je međutim, smanjio ekspresiju gena TLR3, TLR5, C3 i HDAC4. Receptori TLR sudjeluju u prirodnom imunološkom odgovoru. Fibroblasti na svojoj površini i u endosomima sadrže različite molekule TLR (engl. *Toll-like receptor*) (Agarwal i sur. 2001). Smatra se da izvanstanični matriks služi kao ligand za receptore TLR. Isto tako, receptori TLR mogu biti aktivirani s molekulama PAMP (engl. *patogen associated molecular patterns*) i molekulama DAMP (engl. *damage-associated molecular patterns*) (Ganguly i sur. 2009, Midwood i sur. 2009). Molekule DAMP su pro-upalne molekule koje nastaju oštećenjem tkiva, nekrozom stanica ili su to pak dijelovi izvanstaničnog matriksa. Nedavno je otkriveno da receptori TLR sudjeluju u reguliranju apoptoze (Salaun i sur. 2006). Toll-slični receptori također reguliraju prijenos signala uključenih u proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i polarizaciju stanice, a jedna od važnijih uloga je i aktivacija komponenti komplementa (Hasan i sur. 2005, Li i sur. 2010, Lafferty i sur.2010). Moguće je da tijekom različitih faza Dupuytrenove kontraktуре dolazi do promjena u ekspresiji TLR receptora slično kao i npr. koncentracije EGF-a (Augoff i sur. 2003). Dobiveni rezultati upravo potvrđuju da fibroblasti iz palmarne fascije ekspimiraju TLR receptore, stoga je vjerojatno da tijekom remodeliranja tkiva uz istovremeno odvijanje upalnih procesa dolazi do njihove aktivacije putem liganada koji nastaju oslobađanjem iz ekstracelularnog matriksa i nekroznih stanica (DAMP molekule). Naši dobiveni rezultati također ukazuju na mogućnost da TGF- β 1 tijekom rane faze

remoduliranja tkiva i promjena u izvanstaničnom matriksu utišava odnosno drži pod kontrolom upalne mehanizme prirođenog imunološkog odgovora od strane fibroblasta putem smanjenja ekspresije gena za TLR3 i TLR5 receptor. Naime usljed aktivacije TLR receptora tijekom prirođenog imunološkog odgovora dolazi do izlučivanja različitih citokina i kemokina izvan stanice a koji mogu značajno utjecati na različite mehanizme poput upale ili zacjeljivanja rane. (Page i Midwood 2012)

Do danas je objavljeno svega nekoliko radova koji ukazuju na značajnu ulogu komponenti komplementa C3 i C5 koji su ograničeni na njihovu ulogu u zacjeljivanju rana i razvoju plućne fibroze (Cazander i sur. 2012, Addis-Lieser 2005). Poput receptora TLR oni su sastavni dio prirođenog imunološkog odgovora te sudjeluju u nizu imunoloških reakcija. Snažni su kemoatraktanti za fibroblaste, makrofage, neutrofile, mastocite, bazofile te T i B stanice. Osim toga, utvrđena je i njihova uloga u nizu bioloških aktivnosti uključujući: hematopoezu, mišićni razvoj, regeneraciju jetra, preživljavanje stanice i apoptozu (Mastellos i sur. 2002, Cole i sur. 2003, Werfel i sur. 1996). Addis-Lieser i sur. (Addis-Lieser i sur. 2005) su istraživali ulogu komponente komplementa C5 u razvoju plućne fibroze kod miševa. Miševi C5^{-/-} su za razliku od divljeg tipa miševa imali prekomjernu imunološku reakciju tijekom akutne faze, što ukazuje na protuupalni učinak C5. Međutim, u divljem tipu miševa komponenta komplementa C5 je tijekom kronične faze djelovala profibrozno putem modulacije ekspresije TGF- β 1 i MMP-3 (Addis-Lieser i sur. 2005). Navedeni rezultati ukazuju da komponenta komplementa C5 ima sasvim različite uloge u akutnim i kroničnim upalama. U nedavno publiciranom radu su Schmitt i sur. dokazali da nedostatak komponente komplementa C5 značajno usporava razvoj jetrene ciroze (Schmitt i sur. 2012.). Vrlo vjerojatno i u DK komponente komplementa C3 imaju određenu ulogu u ranoj ali i u kasnijim fazama razvoja Dupuytrenove kontrakture. Smanjenje ekspresije C3 komponente djelovanjem TGF- β 1 bi možda moglo značiti da TGF- β 1 na taj način utišava njegovu protuupalnu aktivnost slično kao i komponenta komplementa C5 u divljih miševa tijekom akutne faze (Addis-Lieser i sur. 2005). Primjena C3 komponente komplementa zajedno sa kolagenom je

ubrzala zacjeljivanje površinske rane kod štakora (Hani 2006). Zanimljivo je da TGF- β 1 potiče ekspresiju komponente komplementa C3 u monocitima, a u astrocitima je utišava. (Barnum i Jones 1994, Hogasen i sur. 1995).

Posljednji gen čija je ekspresija snižena nakon tretmana primarnih stanica ND s TGF- β 1 bila je histon deacetilaza 4 (HDAC4) koja regulira ekspresiju gena u stanicama tako što vrši deacetilaciju histona ili ne-histonskih proteina. U našim istraživanjima smo dokazali da TGF- β 1 potiče diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste, a u tom procesu bi ključnu ulogu trebale imati i histon deacetilaze te histon-acetil-transferaze. Naime tijekom diferencijacije je pojačana transkripcijska aktivnost unutar jezgre, što znači da veliki broj transkripcijskih faktora ima pristup promotorskim regijama na DNK molekuli. Važu ulogu u tome ima acetiliranje histona. Histon-acetil-transferaze za razliku od histon deacetilaza, dodavaju acetilne skupine na histone što uzrokuje smanjenje ukupnog pozitivnog naboja histona te oslabljuje njihovo vezanje na DNK. Na taj način se povećava pristupačnost kromatina proteinima koji se vežu na DNK. Pored toga acetilacija ne-histonskih proteina može utjecati na njihovu aktivnost, proteinsku interakciju, lokalizaciju ili vezujuću aktivnost DNK. Stoga je moguće da tretiranje ND stanica sa TGF- β 1 utječe na smanjenje ekspresije HDAC4 a možda i ostalih deacetilaza kako bi kromatin tijekom diferencijacije bio dostupniji transkripcijskim faktorima. Važno u kontekstu DK, pokazano je kako su HDAC uključene u fibrozne procese različitih organa (Marumo i sur. 2009). Glenisson i sur. su također potvrdili da TGF- β 1 potiče diferencijaciju kožnih fibroblasta u miofibroblaste uz pomoć HDAC4 (Glenisson 2007).

Dobiveni rezultati nepobitno su pokazali kako fibroblasti uzgojeni iz tkiva fascije dlana pacijenata oboljelih od DK nakon stimulacije s TGF- β 1 izlučuju različite pro-upalne čimbenike te mijenjaju fenotip uslijed promjene ekspresije grupe gena uključenih u procese fibroze. Poznato je naime kako fibroblasti izlučuju veliki broj molekula sa različitim funkcijama u izvanstanični matriks, prvenstveno se njihovim djelovanjem mijenja signalizacija i struktura vezivnog tkiva. Stoga smo analizirali ukupne izlučene proteine (engl. *secretom*) iz uzgojenih primarnih stanica u okolni hranjivi medij. Pri tome nas je zanimalo da

li postoje proteini čije se izlučivanje povećava tretmanom s TGF- β 1 a smanjuje nakon inhibicije kinaze p38. U tu smo svrhu koristili metodu za razdvajanje ukupnih proteina 1D-elektroforezu, a proteine koji su se diferencijalno izlučili u stanicama nakon stimulacije s TGF- β 1 u odnosu na kontrolu smo identificirali uz pomoć spektrometrije masa (MALDI MS/MS). Do danas je zbog zahtjevnosti metode, objavljen mali broj radova u kojima je istraživani proteinski profil izlučenih proteina u stanični medij. Naime, glavna prepreka u analizi izlučenih proteina je njihova vrlo niska koncentracija zbog čega smo adaptirali metodu. Prije svega smo koristili veliki broj stanica uzgajan uz pomoć telećeg seruma kako ne bi došlo do kontaminacije humanih proteina sa animalnim. Također za obogaćivanje proteina korištene su kolone centrikoni što je dalo bolje rezultate od liofilizacije staničnog medija (Boraldi i sur. 2003).

Nakon proteomske analize dobiven je veliki broj izvanstaničnih proteina, a najzanimljivija su bila tri proteina koja sudjeluju u remodeliranju izvanstaničnog matriksa. Kvalitativna analiza je utvrdila i njihovu različitu ekspresiju u kontrolnim i tretiranim uzorcima. Tako je TGF- β 1 uzrokovao povećanje razine proteina matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2), tkivnog inhibitora matriks metaloproteinaza 1 (TIMP-1) i inhibitora plazminogen inhibitora 1 (PAI-1). Zbog niske koncentracije proteina nije bilo moguće napraviti kvantitativnu analizu. Upravo zbog nemogućnosti kvantitativne analize ekspresije navedenih proteina na 1 DE gelovima odlučili smo utvrditi razinu ekspresije gena koji kodiraju za PAI-1 i TIMP-1 uz pomoć qRT-PCR metode. Utvrđivanje ekspresije gena za MMP-2 nije bilo od velike važnosti budući da je TIMP-1 njen inhibitor. Analizom je utvrđeno da TGF- β 1 značajno povećava ekspresiju gena PAI-1 i TIMP-1, dok tretman stanica s inhibitorom kinaze p38 MAPK značajno smanjuje njihovu ekspresiju. Na temelju dobivenih rezultata se može zaključiti da je vjerojatno za aktivaciju ovih gena važan signalni put p38 MAPK. Navedeni rezultati ukazuju da se prilikom razvoja DK u izvanstaničnom matriksu odvijaju značajne promjene na molekularnoj razini koje su patološki vrlo dobro opisane. Naime, nakupljanje kolagena u izvanstaničnom matriksu podrazumijeva smanjenu proteolitičku aktivnost, dok istovremeno ireverzibilna kontrakcija čvorova upućuje da se

procesu remodeliranja aktivno događaju. Povećana količina inhibitora plazminogen aktivatora (PAI-1) je naime, jedna od glavnih značajki fibroproliferativnih bolesti (Li i sur. 2003, Wang i sur. 2007, Sisson i sur. 2007, Huang i sur. 2007). PAI-1 je glavni inhibitor tkivnog plazminogen aktivatora (tPA) i urokinaznog plazminogen aktivatora (uPA), molekula koje izrezivanjem plazminogena stvaraju plazmin. Plazmin sudjeluje u proteolizi proteina matriksa (fibrin i fibronektin), aktivaciji matriks metaloproteinaza, čimbenika rasta, kolagenaza, te na taj način uzrokuje povećanu razgradnju izvanstaničnog matriksa (Eddy i sur. 2002). Uloga proteina PAI-1 je vrlo zanimljiva u migraciji i adheziji stanica. PAI-1 se izlučuje van stanice i stabilizira vezivanjem na vitronektin (Vn) u izvanstaničnom matriksu. Vitronektin ima zajedničko mjesto vezanja za PAI-1 i urokinazni plazminogen aktivator receptor (uPAR) koje se nalazi vrlo blizu mjesta za vezanje integrina. Stoga PAI-1 ima sposobnost da utječe na metabolizam izvanstaničnog matriksa te vezanje integrina i liganda (Vn-integrin i uPA/uPAR-Vn-integrin) što uzrokuje promjene u staničnom fenotipu i diferencijaciji i/ili stvaranju izvanstaničnog matriksa (Czekay i sur. 2003). Tuan i sur. (Tuan i sur. 2008) su dokazali da tretiranje keloidnih fibroblasta sa PAI-1 specifičnim poliklonalnim antitijelom ili siRNA dovodi do smanjene sinteze odnosno nakupljanja kolagena u izvanstaničnom matriksu. Do sada još nije u literaturi opisano da TGF- β 1 povećava ekspresiju PAI-1 gena i proteina, kao ni to da je njihova razina povećana u tkivu pacijenata oboljelih od DK. Nadalje, za razgradnju i modulaciju vanstaničnog matriksa važne su i različite proteinaze među kojima se ističu matriks metaloproteinaze (MMP). U homeostazi, njihova ekspresija je vrlo niska, a transkripcija gena je kontrolirana upalnim citokinima, čimbenicima rasta, hormonima, međustaničnim interakcijama i interakcijama između stanica i izvanstaničnog matriksa (Clark i sur. 2008). MMP se izlučuju van stanice kao zimogeni (prokolagenaze) koje aktiviraju određeni enzimi (npr. plazminogen). Nakon aktivacije kolagenaza može zatim cijepati kolagen unutar trostruke zavojnice. Denaturirani produkti kolagena (gelatin) se dalje izrezuju gelatinazama. Fragmenti kolagena ulaze u stanicu vezivanjem na specifične membranske receptore ili se razgrađuju na manje peptide sa jakom biološkom

aktivnošću. Kolagenaze MMP-1, MMP-8 i MMP-13 izrezuju kolagen I, II i III. Gelatinaze (MMP-2 i MMP-9) razgrađuju gelatin, a kao i ostale kolagenaze, razgrađuju brojne izvanstanstanične proteine. MMP-2 za razliku od MMP-9 može razgraditi kolagen I, II i III na sličan način kao i kolagenaze. Aktivnost MMP-aza je pod kontrolom α_2 -makroglobulina i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza 1 i 2 (TIMP-1, TIMP-2). Nedavno je utvrđeno kako utišavanje MMP-14 inhibira aktivaciju proMMP-2 u fibroblastima izoliranim iz oboljelog tkiva DK te da utišavanje gena za MMP-14 i MMP-2 inhibira stanicama posredovanu kontrakciju (Wilkinson i sur. 2012). Bilo bi zanimljivo u daljnjim istraživanjima utvrditi povezanost PAI-1, matriks metaloproteinaza i tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza. Naime naša istraživanja su utvrdila povećanu razinu TIMP-1 te PAI-1 proteina koji vjerojatno inhibira aktivaciju velikog broja matriks metaloproteinaza putem inaktivacije tkivnog plazminogen aktivatora (tPA). Međutim, prema našim rezultatima TGF- β 1 je povećao ekspresiju MMP-2 proteina, što bi moglo ukazivati da njegova aktivacija isključivo ovisi o MMP-14, upravo kao što su to i dokazali Wilkinson i sur. U prilog ovoj tezi ide i studija u kojoj je dokazano da MMP-14 aktivira MMP-2 na površini stanice zajedno s TIMP-2 (Sato i sur. 1994). Za razliku od MMP-14, MMP-2 se izlučuje i razgrađuje kolagen na mjestima koja su udaljena od stanice. Oba enzima posjeduju i druge funkcije pa se tako MMP-14 može vezati na CD44 hijaluronski receptor i sindekan1 dok MMP-2 može cijepati kemokin MCP-3/CCL7 koji u fibrozama interagira s TGF- β 1, a ujedno može sudjelovati u aktivaciji latentnog oblika TGF- β 1 (Kajita 2001, Endo 2003, Tatti 2008). Važno je spomenuti da iako su razine TIMP-1 i PAI-1 povećane u oboljelom tkivu a isto tako i u našim pokusima, oni prema literaturnim podacima ne mogu inhibirati MMP-14 na površini stanice (Itoh i sur. 2006). Stoga je vjerojatno da inhibiraju proteinaze koje razgrađuju kolagen udaljen od stanica, za razliku od kolagenaza odnosno kolagena koji se nalazi uz stanice gdje se događaju promjene koje ga remoduliraju pojačavajući kontrakciju (Sabeh i sur. 2009). TIMP su u tkivima najvažniji inhibitori enzima MMP. U ljudskom organizmu su do sada identificirane 4 različite molekule TIMP. Navedene molekule inhibiraju sve MMP, a njihova ekspresija je pod kontrolom

čimbenika rasta i citokina. Ravnoteža između MMP-a i TIMP-a je kritična za promjene izvanstaničnog matriksa u tkivu. Povećana količina TIMP-ova, naročito više od količina MMP su već zamijećene kod različitih fibroznih bolesti (Chirco i sur. 2006), što potvrđuju i naši rezultati za TIMP-1. Nekoliko je studija dokazalo njihovu važnost i moguće sudjelovanje u nastanku i razvoju DK te drugih srodnih bolesti (Ulrich i sur. 2009). Ulrich i sur. su dokazali da snopovi i čvorovi imaju značajno povećanu razinu ekspresije gena za TIMP-1, TIMP-2 i MMP-2 u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Međutim, razina ekspresije gena za TIMP-1 i MMP-2 u čvorovima je bila značajno veća u odnosu na snopove. Naši rezultati su u skladu s navedenim rezultatima jer je TGF- β 1 povećao ekspresiju TIMP-1 i MMP-2 na razini gena i proteina. Kod DK je očigledno poremećena ravnoteža između MMP i njihovih prirodnih inhibitora.

Svi dobiveni rezultati i naša prethodna istraživanja (Kraljevic Pavelic i sur. 2009, Ratkaj i sur. 2012) jasno ukazuju na važnu ulogu signalnog puta p38 MAPK u razvoju simptoma DK. Stoga smo željeli istražiti mogućnost terapijskog ciljanja ove mete u oboljelim stanicama. Zbog složenosti proučavanih promjena i zbog nedostatka animalnog modela za proučavanje uloge TGF- β 1 i inhibitora aktivacije p38 na kontrakciju fibroblasta, u tu smo svrhu koristili trodimenzionalnu kolagensku strukturu mišjeg kolagena tipa I u obliku gela. Kolagen tip I je protein koji je najobilnije zastupljen u zdravoj palmarnoj fasciji te je stoga prikladan za istraživanje kontrakcije fibroblasta tijekom diferencijacije u miofibroblaste, procesa koji se odvija u stanicama oboljelih od DK ali i modelu korištenom u ovom istraživanju. Sve je veći broj istraživanja u kojima se proučavaju strukturne, funkcionalne i mehaničke osobine fibroblasta u interakciji s trodimenzionalnom strukturom kolagenskog matriksa. Trodimenzionalni kolagenski matriks posjeduje jedinstvene karakteristike svojstvene tkivnoj strukturi. U prvom redu stanice mogu prodirati u kolagenski matriks, a adhezija stanica je ograničena na vlakna kolagena te fibroblasti u takvom okruženju zauzimaju «prirodni», geometrijski položaj i imaju sposobnost aktivnog djelovanja na kolagenska vlakna čime ih prevode u stabilne strukture. Mehanički podražaji iz takvog matriksa mijenjaju fenotip stanice što indirektno utječe na morfogenezu

vezivnog tkiva. Međutim, mehanika tkiva ne ovisi samo o karakteristikama pojedinačnih stanica i molekulama matriksa već i o kompleksnoj organizaciji i interakciji koje se događaju između staničnih grupa i njihovog okolnog matriksa. Važno je naglasiti da kolagen I regulira ekspresiju gena i funkciju stanice putem interakcije sa integrinima i diskoidin receptorima. Dobiveni rezultati ukazuju da je TGF- β 1 posredovana kontrakcija fibroblasta uzgojenih u kolagenskom gelu zaista ovisna o aktivaciji/fosforilaciji kinaze p38. Inhibicija signalnog puta p38 MAPK mogla bi stoga predstavljati novi terapijski pristup u liječenju DK, posebno u prevenciji recidiva nakon operativnog zahvata.

6. Zaključak

- Dobiveni rezultati pokazuju da TGF- β 1 u primarnim kulturama stanica oboljelih od Dupuytrenove kontrakture aktivira čitav niz profibroznih gena/proteina: PALLD, α -SMA, IGFR-1, ARHGDI1, THBS-1, EDA-FN, COL1A1, CCL11, IL-6, IL1RAP, PAI-1, TIMP-1, MMP-2 i istovremeno smanjuje ekspresiju gena: C3, FLT3LG, IL6R, LY96, TIRAP, TLR3, TLR5 i HDAC4
- Inhibicija fosforilacije p38 MAPK je u potpunosti inhibirala kinazu nizvodno od p38, točnije kinazu MAPKAPK2 što je dovelo do smanjene ekspresije gena: PALLD, α -SMA, THBS-1, PAI-1, TIMP-1, CCL11
- TGF- β 1 - posredovana kontrakcija fibroblasta uzgojenih u kolagenskom gelu je ovisna o aktivaciji/fosforilaciji p38
- Haplotipska analiza polimorfizama rs1800597, rs1800795 i rs1800796 utvrdila je visok stupanj neravnoteže udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*, LD) za spomenute biljege u promotorskoj regiji IL-6 gena upućujući na veliku vjerojatnost (75%) da spomenuti polimorfizmi nasljeđuju zajedno u bloku
- Frekvencija haplotipa AGG je značajno različita između kontrolne skupine i pacijenata oboljelih od DK
- Inhibicija signalnog puta p38 MAPK mogla bi predstavljati novi terapijski pristup u liječenju Dupuytrenove kontrakture, posebno u prevenciji recidiva nakon operativnog zahvata

7. Literatura

Abbas AK, Lichtman AH (2005) Cellular and molecular immunology. 5th. Saunders, Philadelphia, PA

Addis-Lieser E, Köhl J, Chiaramonte MG. Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* (2005) 175(3): 1894-902.

Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, Parks DH, Mayes MD, Arnett FC, Tan FK. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (2011) 13 (1): 243-254.

Agostini C, Gurrieri C. Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* (2006) 3(4): 357-63.

Al-Qattan MM. Factors in the pathogenesis of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Am* (2006) 31(9): 1527-34.

Anthony SG, Lozano-Calderon SA, Simmons BP, Jupiter JB. Gender Ratio of Dupuytren's Disease in the Modern U.S. Population. *Hand* (2007) 3: 87–90.

Andrew JG, Andrew SM, Ash A, Turner B. An investigation into the role of inflammatory cells in Dupuytren's disease. *The Journal of Hand Surgery* (1991) 16 (3): 267–271.

Arafa M, Noble J, Royle SG, et al. Dupuytren's and epilepsy revisited. *J Hand Surg* (1992) 17: 221–4.

Arkkila PE, Kantola IM, Viikari JS. Dupuytren's disease: association with chronic diabetic complications. *J Rheumatol* (1997) 24: 153–9.

Arkkila PE, Kantola IM, Viikari JS, et al. Dupuytren's disease in type 1 diabetic patients: a five-year prospective study. *Clin Exp Rheumatol* (1996) 14: 59–65.

Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* (2002) 72 (6): 631-43.

Atasoy U, Curry SL, de Silanes IL, Shyu AB, Casolaro V, Gorospe M, Stellato C. Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Immunol* (2003) 171: 4369–4378.

Augoff K, Kula J, Gosk J, Rutovski R. Epidermal Growth factor in Dupuytren's Disease. *Plast Reconstr Surg* (2005) 115: 128-133.

Badalamente MA, Hurst LC, Grandia SK, Sampson SP. Platelet-derived growth factor in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* (1992) 17 (2): 317-23.

Badalamente MA, Sampson SP, Hurst LC, Dowd A, Miyasaka K. The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* (1996) 21 (2): 210-5.

Bailey AJ, Sims TJ, Gabbiani G, Bazin S, LeLous M. Collagen of Dupuytren's disease. *Clin Sci Mol Med.* (1977) 53 (5): 499-502.

Baird KS, Alwan WH, Crossan JF, Wojciak B. T-cell-mediated response in Dupuytren's disease. *Lancet* (1993) 341 (8861): 1622-3.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* (2002) 115: 3719 –3727.

Barnum SR, Jones JL. Transforming growth factor-b1 inhibits inflammatorycytokine-induced C3 gene expression in astrocytes. *J Immunol* (1994) 152:765–772.

Bazin S, Le Lous M, Duance VC, Sims TJ, Bailey AJ, Gabbiani G, D'Andiran G, Pizzolato G, Browski A, Nicoletis C, Delaunay A. Biochemistry and histology of the connective tissue of Dupuytren's disease lesions. *Eur J Clin Invest* (1980) 10 (1): 9-16.

Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Alansari A, Shah M, Ferguson MW, Ollier WE. Genetic susceptibility in Dupuytren's disease. TGF- β 1 polymorphisms and Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br* (2002) 84 (2): 211-5.

Bayat A, Stanley JK, Watson JS, Ferguson MW, Ollier WE. Genetic susceptibility to Dupuytren's disease: transforming growth factor β receptor (TGF β R) gene polymorphisms and Dupuytren's disease. *Br J Plast Surg* (2003) 56 (4): 328-33.

Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Ferguson MW, Ollier WE. Genetic susceptibility to dupuytren disease: association of Zf9 transcription factor gene. *Plast Reconstr Surg* (2003) 111 (7): 2133-9.

Bayat A, Walter J, Lambe H, Watson JS, Stanley JK, Marino M, Ferguson MW, Ollier WE. Identification of a novel mitochondrial mutation in Dupuytren's disease using multiplex DHPLC. *Plast Reconstr Surg* (2005) 115 (1): 134-41.

Bayat A, Winder C , Stanley J, Day P and Goodacre R. Proteome analysis of Dupuytren's disease differentiating between diseas tissue phenotypes (nodule, cord, and transverse palmar fascia) and control palmar fascia. *J Hand surg* (2006) 31: 5.

Berge G, Pohl G. Die Dupuytren – Erkrankung im hohen Lebensalter. Behandlungsstrategie und Ergebnisse. Zentralblatt für Chirurgie (1988) 113: 313–317.

Berndt A, Kosmehl H, Mandel U, Gabler U, Luo X, Celeda D, Zardi L, Katenkamp D. TGF beta and bFGF synthesis and localization in Dupuytren's disease (nodular palmar fibromatosis) relative to cellular activity, myofibroblast phenotype and oncofetal variants of fibronectin. Histochem J (1995) 27 (12): 1014-20.

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin AV, Aakre M, Lundquist CA, Engel M, Arteaga CL, Moses HL. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. Mol Biol Cell (2001) 12: 27–36.

Bisson MA, McGrouther DA, Mudera V, Grobbelaar AO. The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of alpha-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-beta1. J Hand Surg Br (2003) 28 (4): 351-6.

Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. Cytokine Growth Factor Rev (2004) 15 (4): 255-273.

Boraldi F, Bini L, Liberatori S, Armini A, Pallini V, Tiozzo R, Ronchetti IP, Quaglino D. Normal human dermal fibroblasts: proteomic analysis of cell layer and culture medium. Electrophoresis (2003) 24 (7-8): 1292-310.

Borstein P. Thrombospondin as matricellular modulator of cell function. J Clin Invest (2001) 107: 929-934.

Boukhelifa M, Hwang SJ, Valtschanoff JG, Meeker RB, Rustioni A, Otey CA. A critical role for palladin in astrocyte morphology and response to injury. Mol Cell Neurosci (2003) 23: 661–8.

Bower M, Nelson M, Gazzard BG. Dupuytren's contractures in patients infected with HIV. British Medical Journal (1990) 300 (6718): 164

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol (2002) 3: 207–214.

Bujor AM, Pannu J, Bu S, Smith EA, Muise-Helmericks RC, Trojanowska M. Akt blockade downregulates collagen and upregulates MMP1 in human dermal fibroblasts. J Invest Dermatol (2008) 128(8): 1906-1914.

Bunker TD, Reilly J, Baird KS, Hamblen DL. Expression of growth factors, cytokines and matrix metalloproteinases in frozen shoulder. J Bone Joint Surg Br (2000) 82(5): 768-73.

Burge P, Hoy G, Regan P, Milne R. Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* (1997) 79B: 206-210.

Burge P. Genetics of Dupuytren's disease. *Hand Clin* (1999) 15: 63-71.

Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol.* (1999) 112(1): 49-57.

Chevallet M, Diemer H, Van Dorssealer A, Villiers C, Rabilloud T. Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics.* (2007) 7(11):1757-70.

Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *ancer Metastasis Rev* (2006) 25 (1): 99-113.

Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* (2008) 40 (6-7):1362-78.

Cogan JG, Subramanian SV, Polikandriotis JA, Kelm RJ Jr, Strauch AR. Vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription during myofibroblast differentiation requires Sp1/3 protein binding proximal to the MCAT enhancer. *J Biol Chem* (2002) 277 (39): 36433-42.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* (1996) 271(2): 736-41.

Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci* (2003) 104: 455-466.

Cordova A, Tripoli M, Corradino B, Napoli P, Moschella F. Dupuytren's contracture: an update of biomolecular aspects and therapeutic perspectives. *The Journal of Hand Surgery* (2005) 16: 557-562.

Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* (2004) 3 (4): 223-31.

Cozen W, Gebregziabher M, Conti DV, Van Den Berg DJ, Coetzee GA, Wang SS, et al. Interleukin-6-related genotypes, body mass index, and risk of multiple myeloma and plasmacytoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006) 15: 2285-91.

Cowin AJ. Role of the actin cytoskeleton in wound healing and scar formation. *Primary Intention* (2006) 14: 39-42.

Critchley EM, Vakil SD, Hayward HW, et al. Dupuytren's disease in epilepsy: result of prolonged administration of anticonvulsants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1976) 39: 498–503.

Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* (2003) 160: 781–791.

Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* (2008) 121: 255-264.

de-Madaria E, Martinez J, Sempere L, Lozano B, Sanchez-Paya J, Uceda F, et al. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: Association with etiology, severity, and cytokine levels in blood. *Pancreas* (2008) 37:295–301.

Donnini S, Morbidelli L, Taraboletti G, Ziche M. ERK1-2 and p38 MAPK regulate MMP/TIMP balance and function in response to thrombospondin-1 fragments in the microvascular endothelium. *Life Sci* (2004) 74(24): 2975-2985.

Duncan MR and Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *Journal of Investigative Dermatology* (1991) 97 (4): 686–692.

Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* (2002) 13: 902–914.

Elliot D, Ragoowansi R. Dupuytren's disease secondary to acute injury, infection or operation distal to the elbow in the ipsilateral upper limb—a historical review. *J Hand Surg* (2005) 30B: 148 –156.

Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem* (2003) 278 (42): 40764-70.

Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* (2005) 125 (4): 615-28.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2005) 21: 659-93.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* (1989) 246 (4926): 64-71.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, WooP. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-

6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* (1998) 102:1369–76.

Flatt AE. The Vikings and Baron Dupuytren's disease. *Bayl Univ Med Cent Proc* (2001) 14 (4): 378–384.

Flint MH, Gillard GC, Reilly HC. The glycosaminoglycans of Dupuytren's disease. *Connect Tissue Res* (1982) (3): 173-9.

French PD, Kitchen VS, Harris JRW. Prevalence of Dupuytren's contracture in patients infected with HIV. *BMJ* (1990) 300: 164-165.

Gabbiani G, Majno G. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* (1972) 66: 131-146.

Gaestel M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) 7 (2): 120-30.

Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* (2009) 206:1983–1994.

Geoghegan KF, Kelly MA. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom Rev* (2005) 24 (3): 347.

Gerard C & Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nature Immunology* (2001) 2: 108 – 115.

Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* (2006) 363: 32-47.

Glenisson W, Castronovo V, Waltregny D. Histone deacetylase 4 is required for TGFbeta1-induced myofibroblastic differentiation. *Biochim Biophys Acta* (2007)1773: 1572–1582.

Goicoechea S, Orr AW, Pallero MA, Eggleton P, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J Biol Chem* (2000) 275: 36358-36368.

Gonzalez AM, Buscaglia M, Fox R, Isacchi A, Sarmientos P, Farris J, Ong M, Martineau D, Lappi DA, and Baird A. Basic fibroblast growth factor in Dupuytren's contracture. *Am J Pathol* (1992)141 (3): 661–671.

Gordon A, Kiss-Toth E, Stockley I, Eastell R, Wilkinson JM. Polymorphisms in the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty. *Arthritis Rheum* (2008) 58: 3157–65.

Graves PR, Haystead TAJ. A Functional Proteomics Approach to Signal Transduction. *Recent Progress in Hormone Research* (2003) 58: 1-24.

Greenwood JA, Pallero MA, Theibert AB, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin signaling of focal adhesion disassembly requires activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* (1998) 273: 1755-1763.

Grinnell F. Fibroblast mechanics in three dimensional collagen matrices. *J Bodyw Mov Ther* (2008)12(3): 191–193.

Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2010) 26: 335-61.

Gudmundsson KG, Arngrímsson R, Arinbjarnarson S, Olafsson A, Jonsson T. T- and B-lymphocyte subsets in patients with Dupuytren's disease. Correlations with disease severity. *J Hand Surg Br* (1998) 23 (6): 724-7.

Hart MG, Hooper G. Clinical associations of Dupuytren's disease. *Postgrad Med J* (2005) 81: 425–428.

Hasan UA, Trinchieri G, Vlach J. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem* (2005) 280 (21): 20620-7.

Heathcote JG, Cohen H, Noble J. Dupuytren's disease and diabetes mellitus. *Lancet* (1981) i: 1420.

Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* (2003) 14 (5): 538-46.

Hinz B. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol* (2006) 85(3-4): 175-81.

Hogaboam CM, Gallinat CS, Bone-Larson C, Chensue SW, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Collagen deposition in a non-fibrotic lung granuloma model after nitric oxide inhibition. *Am J Pathol* (1998) 153: 1861–1872.

Hogasen AKM, Hestdal K, Hogasen K, Abrahamsen TG. Transforming growth factor b modulates C3 and factor B biosynthesis and complement receptor 3 expression in cultured human monocytes. *J Leukoc Biol* (1995) 57:287–296.

Howard JC, Varallo VM, Ross DC, Faber KJ, Roth JH, Seney S, Gan BS. Wound healing-associated proteins Hsp47 and fibronectin are elevated in Dupuytren's contracture. *J Surg Res* (2004) 117(2): 232-238.

Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2003) 29 (3 Pt 1): 397-404.

Hu FZ, et al. Mapping of an autosomal dominant gene for in Dupuytren's contracture to chromosome 16q in a Swedish family. *Clin Genet* (2005) 68: 424-429.

Huang Y, Noble NA. PAI-1 as a target in kidney disease. *Curr Drug Targets* (2007) 8: 1007–1015.

Huax F, Gharaee-Kermani M, Liu T, Morel V, McGarry B, Ullenbruch M, Kunkel SL, Wang J, Xing Z, Phan SH. Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am J Pathol* (2005) 167(6): 1485-96.

Huber MA, Kraut N, Addicks T, Peter RU. Cell-type-dependent induction of eotaxin and CCR3 by ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 269: 546–552.

Hueston JT. Further studies on the incidence of Dupuytren's contracture. *Med J Aust* (1962) 21; 49(1): 586-8.

Hurst LC, Badalamente MA. Histopathology and cell biology. U: Tubiana R, Leclercq C, Hurst LC et al. (ed.) Dupuytren's Disease. London: Martin Dunitz, (2000) 59-77.

Irwin CR, Myrillas TT, Traynor P, Leadbetter N, and Cawston TE. The role of soluble interleukin (IL)-6 receptors in mediating the effects of IL-6 on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology* (2002) 73 (7): 741–747.

Itoh Y. MT1-MMP: A Key Regulator of Cell Migration in Tissue. *IUBMB Life* (2006) 58 (10): 589 – 596.

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* (2002) 84: 57-80.

Jemec B, Grobbelaar AO, Wilson GD, Smith PJ, Sanders R, McGrouther DA. Is Dupuytren's disease caused by an imbalance between proliferation and cell death? *J Hand Surg Br* (1999) 24(5): 511-4.

Johnston P, Chojnowski AJ, Davidson RK, Riley GP, Donell ST, Clark IM. A Complete Expression Profile of Matrix-Degrading Metalloproteinases in Dupuytren's Disease. *J Hand Surg* (2007) 32A: 343–351.

Johnston P, Larson D, Clark IM, Chojnowski AJ. Metalloproteinase gene expression correlates with clinical outcome in Dupuytren's Disease. *J Hand Surg Am.* (2008) 33 (7): 1160-7.

Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije*. Školska knjiga (2006).

Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153 (2001) 893–904.

Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol* (2005) 52 (2): 329-37.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* (1988) 60 (20): 2299–301.

Khalil N, Xu YD, Duronio V. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by Transforming Growth factor-1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J Biol Chem* (2005) 280: 43000-43009.

Knappe UJ, Fink T, Fisseler-Eckhoff A, Schoenmayr R. Expression of extracellular matrix-proteins in perisellar connective tissue and dura mater. *Acta Neurochir (Wien)* (2010) 152 (2): 345-353.

Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* (1996) 271: 1544 –1550.

Kraljevic Pavelic S, Bratulic S, Hock K, Jurisic D, Hranjec M, Karminski-Zamola G, Zinic B, Bujak M, Pavelic K. Screening of potential prodrugs on cells derived from Dupuytren's disease patients. *Biomed Pharmacother* (2009) 63 (8): 577-85.

Kraljević Pavelić, Sandra; Ratkaj, Ivana. Microarray expression analysis of primary Dupuytren's contracture cells // Dupuytren's disease and related hyperproliferative disorders / Eaton C SM, Bayat A, Gabbiani G, Werker P, Wach W (ur.). Berlin Heidelberg : Springer Verlag, 2012. Str. 109-113.

Kraljevic Pavelic S, Sedic M, Hock K, Vucinic S, Jurisic D, Gehrig P, Scott M, Schlapbach R, Cacev T, Kapitanovic S, Pavelic K. An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Pathol* (2009) 217: 524-533.

Krause C, Kloen P and ten Dijke P. Elevated transforming growth factor β and mitogen-activated protein kinase pathways mediate fibrotic traits of Dupuytren's disease fibroblasts. *Fibrogenesis & Tissue Repair* (2011) 4: 14.

Lafferty EI, Qureshi ST, Schnare M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. *J Inflamm (Lond)* (2010) 25: 7-57.

Lamkhioued B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansour N, Delespesse G, Renzi PM. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34(+) progenitor cells. *J Immunol* (2003) 170:537–547.

Langdon C, Kerr C, Tong L, Richards CD. Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol* (2003) 170:548–555.

Larson RD, Takagishi N, Posch JL. The pathogenesis of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg* (1960) 42A: 993–1007.

Lawson PM, Maneschi F, Kohner EM. The relationship of hand abnormalities to diabetes and diabetic retinopathy. *Diabetes Care* (1983) 6: 140–3.

Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* (2010) 49(1):1-9.

Li WY, Chong SS, Huang EY, Tuan TL. Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing?. *Wound Repair Regen* (2003) 11: 239–247.

Liu T, Warburton RR, Guevara OE, Hill NS, Fanburg BL, Gaestel M, Kayyali US. Lack of MK2 inhibits myofibroblast formation and exacerbates pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2007) 37 (5): 507-17.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) 193 (1): 265–75.

Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* (2001) 1 (2): 108-16.

Lupher ML, and Gallatin WM. Regulation of fibrosis by the Immune system. *Advances in immunology* (2006) 89: 245-277.

Marumo T, Hishikawa K, Yoshikawa M, Hirahashi J, Kawachi S, Fujita T. Histone deacetylase modulates the proinflammatory and -fibrotic changes in tubulointerstitial injury. *Am J Physiol Renal Physiol* (2010) 298 (1): F133-41.

Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* (2005) 19: 2783–2810.

Mastellos D, Lambris JD. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens?. *Trends Immunol* (2002) 23: 485-491.

Matsuoka H, Arai T, Mori M, Goya S, Kida H, Morishita H, Fujiwara H, Tachibana I, Osaki T, Hayashi S. A p38 MAPK inhibitor, FR-167653, ameliorates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2002) 283 (1): L103-12.

McCarty S, Syed F, Bayat A. Role of the HLA System in the Pathogenesis of Dupuytren's Disease. *Hand (NY)* (2010) 5 (3): 241-50.

McFarlane. The anatomy of Dupuytren's disease. *Dupuytren's disease 2nd edn* Churchill livingstone Edinburgh London Melbourne (1987) 348-374.

Michou L, Lermusiaux JL, Teyssedou JP, Bardin T, Beaudreuil J, Petit-Teixeira E. Genetics of Dupuytren's disease. *Joint Bone Spine* (2011) 79 (1): 7-12.

Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F, Foxwell B. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* (2009) 15: 774–780.

Mihara M, Moriya Y, Kishimoto T, and Ohsugi Y. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *British Journal of Rheumatology* (1995) 34 (4): 321–325.

Mihara M, Moriya Y and Ohsugi Y. "IL-6-soluble IL-6 receptor complex inhibits the proliferation of dermal fibroblasts". *International Journal of Immunopharmacology* (1996) 18 (1): 89–94.

Mikkelsen OA. Knuckle pads in Dupuytren's disease *Hand*. (1977) 9 (3): 301-5.

Moodley YP, Misso NL, Scaffidi AK, Fogel-Petrovic M, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, Knight DA. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2003) 29 (4): 490-8.

Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci* (2004) 36(2): 71-8.

Murrel GAC, Francis MJO, Howlett CR. Dupuytren's contracture. Fine structure in relation to aetiology. *J Bone Joint Surg* (1989) 71B: 367–373.

Neumuller J, Menzel J & Millesi H. Prevalence of HLA-DR3 and autoantibodies to connective components in Dupuytren s contracture. *Clin Immunol Immunopathol* (1994) 71: 142-148.

Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1999) 104:723-742.

Noble J, Heathcote JG, Cohen H. Diabetes mellitus in the aetiology of Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br* (1984) 66 (3): 322-5.

O'Gorman D, Howard JC, Varallo VM, Cadieux P, Bowley E, McLean K, Pak BJ, Gan BS. Identification of protein biomarkers in Dupuytren's contracture using surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). *Clin Invest Med* (2006) 29(3):136-45.

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* (1997) 272: 2446 –2451.

Okamoto M, Ono M, Uchiumi T, Ueno H, Kohono K, Sugimachi K, Kuwano M. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human cancer cells—transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim Biophys Acta* (2002) 1574(1): 24-34.

Pagnotta A, Specchia N, Greco F. Androgen receptors in Dupuytren's contracture. *J Orthop Res* (2002) 20 (1): 163-8.

Pagnotta A, Specchia N, Soccetti A, Manzotti S, Greco F. Responsiveness of Dupuytren's disease fibroblasts to 5 α -dihydrotestosterone. *Journal of Hand Surgery* (2003) 28 (6): 1029-1034.

Parast MM, Otey CA. Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions. *J Cell Biol* (2000) 150: 643–56.

Pereira RS, Black CM, Turner SM & Spencer JD. Antibodies to collagen types I-VI in Dupuytren s contracture. *J Hand Surg Br* (1986) 11: 58-60.

Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* (1999) 112: 4557–4568.

Plander M, Salamon A, Toldy E, Kiss G, Kovács GL. Cellular immune response in Dupuytren's disease. *Biochimica Medica* (2008) 18 (2): 193-200.

Plewes LW. Sudeck's atrophy in hand. *J Bone Joint Surg* (1956) 38B: 195–203.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* (1999) 277: C1-9.

Price KS, Friend DS, Mellor EA, De Jesus N, Watts GFM, Boyce J. CC Chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates Immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2003) 28: 420-7.

Puxeddu I, Bader R, Piliponsky AM, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 117(1): 103-10.

Rachlin AS, Otey C. A Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and paladin. *J Cell Sci* (2006) 119: 995–1004.

Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Experimental cell research* (2011) 317: 575–589.

Qureshi FI, Hornigold R, Spencer JD, Hall SM. Langerhans cells in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Br* (2001) 26(4): 362-7.

Ratkaj I, Bujak M, Jurišić D, Baus Lončar M, Bendelja K, Pavelića K, Kraljević Pavelića S. Microarray Analysis of Dupuytren's Disease Cells: The Profibrogenic Role of the TGF- β Inducible p38 MAPK Pathway. *Cell Physiol Biochem* (2012) 30: 927-942.

Rayan GM, Parizi M, Tomasek JJ. Pharmacologic regulation of Dupuytren's fibroblast contraction *in vitro*. *J Hand Surg* (1996) 21A: 1065–1070.

Rayan GM. Clinical presentation and types of Dupuytren's disease. *Hand Clin* (1999) 15: 87-96.

Rayan GM. Dupuytren Disease: Anatomy, Pathology, Presentation, and Treatment. *The Journal of Bone & Joint Surgery* (2007) 89: 189-198.

Rehman S, Salway F, Stanley JK, Ollier WE, Day P, Bayat A. Molecular phenotypic descriptors of Dupuytren's disease defined using informatics analysis of the transcriptome. *J Hand Surg Am* (2008) 33: 359-372.

Sabeh F, Li XY, Saunders TL, Rowe RG, Weiss SJ. Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion. *J Biol Chem* (2009) 284 (34): 23001-11.

Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells. *Journal of Immunology* (2006) 176: 4894–4901.

Satish L, LaFramboise WA, O'Gorman DB, Johnson S, Janto B, Gan BS, Baratz ME, Hu FZ Post JC, Ehrlich GD and Kathju S. Identification of differentially expressed genes in fibroblasts derived from patients with Dupuytren's Contracture. *BMC Medical Genomics* (2008) 1:10.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*. (1994) 370 (6484): 61-5.

Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* (2006) 63(5): 321-9.

Schmitt J, Roderfeld M, Sabrane K, Zhang P, Tian Y, Mertens JC, Frei P, Stieger B, Weber A, Müllhaupt B, Roeb E, Geier A. Complement factor C5 deficiency significantly delays the progression of biliary fibrosis in bile duct-ligated mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2012) 418 (3): 445-50.

Sedić M, Jurišić D, Stanec Z, Hock K, Pavelić K, Kraljević Pavelić S. Functional genomics in identification of drug targets in Dupuytren's contracture. *Frontiers in bioscience* 15 (2010) : 57-64.

Seong GJ, Hong S, Jung SA, Lee JJ, Lim E, Kim SJ, Lee JH. TGF-beta-induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Vis* (2009) 21 (15): 2123-8.

Seong GJ, Hong S, Jung SA, Lee JJ, Lim E, Kim SJ, Lee JH. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* (2003) 113 (6): 685-700.

Shan B, Klingsberg RC, Qin X, and Lasky JA. Abrogation of TGF-β1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2009) 297(5): L864–L870.

Shih B, Wijeratne D, Armstrong DJ, Lindau T, Day P, Bayat A. Identification of biomarkers in Dupuytren's disease by comparative analysis of fibroblasts versus tissue biopsies in disease-specific phenotypes. *J Hand Surg Am* (2009) 34 (1): 124-36.

Shih B, Bayat A. Scientific understanding and clinical management of Dupuytren disease. *Nat Rev Rheumatol* (2010) (12): 715-26,

Sinno H, Malholtra M, Lutfy J, Jardin B, Winocour S, Brimo F, Beckman L, Watters K, Philip A, Williams B, Prakash S. Topical application of complement C3 in collagen formulation increases early wound healing. *J Dermatolog Treat* (2011)

Sisson TH, Simon RH. The plasminogen activation system in lung disease. *Curr Drug Targets* (2007) 8: 1016–1029.

Sivakumar P and Das AM. Fibrosis, chronic inflammation and new pathways for drug discovery. *Inflamm res* (2008) 57: 410–418.

Sottile J, Hocking DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* (2002) 13(10): 3546-3559.

Spencer JD, & Walsh KI. Histocompatibility antigen patterns in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Br* (1984) 9: 276-278.

Spinale FG. Cell-matrix signaling and thrombospondin: another link to myocardial matrix remodeling. *Circ Res* (2004) 95 (5): 446-8.

Sporri B, Muller KM, Wiesmann U, and Bickel M. "Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts". *International Immunology* (1999) 11 (7): 1053–1058.

Stahl S, Calif E. Dupuytren's palmar contracture in women. *Isr Med Assoc J* (2008) 10 (6): 445-7.

Steen H & Mann M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2004) 5: 699-711.

Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* (2007) 127 (5):1009-17.

Sugiyama N, Kohno M and Yokoyama T. Transplantation Inhibition of the p38 MAPK pathway ameliorates renal fibrosis in an NPHP2 mouse model. *Nephrology Dialysis* (2010) 27: 1351-58.

Szardening-Kirchner C, Konrad L, Hauck EW, Haag SM, Eickelberg O, Weidner W. Upregulation of mRNA expression of MCP-1 by TGF-beta1 in fibroblast cells from Peyronie's disease. *World J Urol* (2009) 27 (1):1 23-30.

Sweetwyne MT, Pallero MA, Lu A, Van Duyn Graham L, Murphy-Ullrich JE. The Calreticulin-Binding Sequence of Thrombospondin 1 Regulates Collagen Expression and Organization During Tissue Remodeling. *Am J Pathol* (2010)

Tan JQ, Jacobi HH, Jing C, Millner A, Sten E, Hviid L, Anting L, Ryder LP, Glue C, Skov PS, Jarman E, Lamberth K, Malling HJ, Poulsen LK. CCR3 expression induced by IL-2 and IL-4 functioning as a death receptor for B cells. *J Immunol* (2003) 171:1722–1731.

Tatti O, Vehviläinen P, Lehti K, Keski-Oja J. MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1. *Exp Cell Res* (2008) 314 (13): 2501-14.

Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, Schroder JM. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med* (1999) 20:777–786.

Terek RM, Jiranek WA, Goldberg MJ, Wolfe HJ, Alman BA. The expression of platelet-derived growth-factor gene in Dupuytren contracture. *J Bone Joint Surg Am* (1995) 77 (1): 1-9.

Terry C, Loukaci V, Green F. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* (2000) 275: 18138–44.

Thomas A, Bayat A. The emerging role of *Clostridium histolyticum* collagenase in the treatment of Dupuytren disease. *Ther Clin Risk Manag* (2010) 6: 557–572.

Thuraisingam T, Xu YZ, Eadie K, Heravi M, Guiot MC, Greemberg R, Gaestel M, Radzioch D. MAPKAPK-2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* (2010) 130 (1): 278-86.

Tomasek JU, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano - regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3: 349-363.

Tomasek JJ, McRae J, Owens GK, Haaksma CJ. Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CARG element and the transforming growth factor-beta1 control element. *Am J Pathol* (2005) 166 (5): 1343-51.

Tuan TL, Wu H, Huang EY, Chong SS, Laug W, Messadi D, Kelly P, Le A. Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures. *Am J Pathol* (2003) 162: 1579–1589.

Tuan TL, Hwu P, Ho W, Yiu P, Chang R, Wysocki A, Benya PD. Adenoviral overexpression and small interfering RNA suppression demonstrate that

plasminogen activator inhibitor-1 produces elevated collagen accumulation in normal and keloid fibroblasts. *Am J Pathol* (2008) 173(5): 1311-25.

Tubiana R, Leclercq C, C. Hurst, Badalante M, J Mackin E. Dupuytren's disease. Martin Dunitz LTD, London (2000).

Tunn S, Gurr E, Delbrück A, Buhr T, Flory J. The distribution of unsulphated and sulphated glycosaminoglycans in palmar fascia from patients with Dupuytren's disease and healthy subjects. *J Clin Chem Clin Biochem* (1988) 26 (1): 7-14.

Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* (2005) 16: 4214–4224.

Ullrich-Murphy JE, Poczatek M. Activation of latent TGF- β by trombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* (2000) 11: 59-69.

Ulrich D, Hrynyszyn K, Pallua N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg* (2003) 112 (5): 1279-86.

Ulrich D, Ulrich F, Piatkowski A, Pallua N. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cords and nodules of patients with Dupuytren's disease. *Arch Orthop Trauma Surg* (2009) 129 (11): 1453-9.

Vi L, Feng L, Zhu RD, Wu Y, Satish L, Gan BS, O'Gorman DB. Periostin differentially induces proliferation, contraction and apoptosis of primary Dupuytren's disease and adjacent palmar fascia cells. *Exp Cell Res* (2009) 315 (20): 3574-86.

Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Lett* (2007) 581: 3098–3104.

Weiss SW, Goldblum JR, and Enzinger FM. *Soft Tissue Tumors*. (2008) 227–228, Mosby Elsevier, Philadelphia, Pa, USA,.

Wenzel SE, Trudeau JB, Barnes S, Zhou X, Cundall M, Westcott JY, et al. TGF-beta and IL-13 synergistically increase eotaxin-1 production in human airway fibroblasts. *J Immunol* (2002) 169: 4613-9.

Werfel T, Oppermann M, Butterfield JH, Begemann G, Elsner J, Gotze O, Zwirner J. The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a. *Scand J Immunol* (1996) 44: 30-36.

Werker PM, Pess GM, van Rijssen AL, Denkler K. Correction of contracture and recurrence rates of Dupuytren contracture following invasive treatment: the importance of clear definitions. *J Hand Surg Am.* (2012) 37(10): 2095-2105.

White ES, Sagana RL, Booth AJ, Yan M, Cornett AM, Bloomheart CA, Tsui JL, Wilke CA, Moore BB, Ritzenthaler JD, Roman J, Muro AF. Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Exp Cell Res* (2010) 316(16): 2644-2653.

Wildebrand S, Ekbom A and Gerdin B. Cancer incidence in patients treated surgically for Dupuytren's disease. *Journal of Hand Surgery* (2000) 25B: (3): 283-287.

Wilbrand S, Ekbom A, Gerdin B. Dupuytren's contracture and sarcoma. *J Hand Surg Br* (2002) 27(1): 50-2.

Wilkinson JM, Davidson RK, Swingler TE, Jones ER, Corps AN, Johnston P, Riley GP, Chojnowski AJ, Clark IM. MMP-14 and MMP-2 are key metalloproteases in Dupuytren's disease fibroblast-mediated contraction. *Biochim Biophys Acta* (2012) 1822 (6): 897-905.

Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* (2007) 117: 524–529.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* (2008) 214 (2): 199-210.

Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* (2003) 111(2): 227-42.

Yu L, Hébert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* (2002) 15;21(14): 3749-59.

POPIS KRATICA

DK - Dupuytrenova kontraktura

DMSO – dimetil sulfoksid

DMEM – Dulbecco modificirani Eagle medij

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ECM – izvanstanični matriks

MAPKAPK-2 (MK2) – MAPK aktivirana protein kinaza-2

MeCN – acetonitril

SB203580 – inhibitor p38 MAPK kinaze

TFA-trifluoroctena kiselina

ZF9 – protein zinc-finger 9

SAŽETAK

Dupuytrenova kontraktura (DK) je benigni proliferativni poremećaj palmarne fascije, karakteriziran nemalignom transformacijom vezivnog tkiva u dlanu. Etiologija bolesti nije u potpunosti razjašnjena. Obilježja bolesti su povećana proliferacija fibroblasta/miofibroblasta, prekomjerno izlučivanje kolagena, promjene u izvanstaničnom matriksu te kontrakcija miofibroblasta. Miofibroblasti su naime, esencijalna komponenta bolesti, a smatraju se sastavnim dijelom prirođenog imunološkog sustava jer sadrže određene funkcije i receptore svojstvene makrofazima. Zahvaljujući tim karakteristikama, posjeduju sposobnost aktivnog poticanja upalnog odgovora pojačavajući fibrozne procese. Bolest se liječi kirurški što ne osigurava potpuno izlječenje niti pojavu recidiva. Bolje razumijevanje patogeneze bolesti važno je u svrhu pronalaženja novih dijagnostičkih i terapijskih meta. Kod Dupuytrenove bolesti, transformirajući čimbenik rasta (TGF- β 1) ima ključnu ulogu u stvaranju kolagena, poticanju proliferacije fibroblasta/miofibroblasta i njihove kontrakcije. Signalni put p38 MAPK je jedan u nizu signalnih putova unutar stanice kojeg aktivira TGF- β 1. Osobito je u tom signalnom putu zanimljiva serin/treonin mitogen aktivirana protein kinaza (MAPK) - aktivirana protein kinaza-2 (MAPKAPK2 ili MK2) koja zajedno s MK3 kinazom predstavlja glavnu nizvodnu metu za p38 MAPK. MK2 ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, remodeliranju aktina, razvoju stanice, migraciji i proizvodnji citokina/kemokina. Koristeći primarne stanične kulture pacijenata oboljelih od Dupuytrenove kontrakture istražena je uloga p38 MAPK signalnog puta u nastanku ove fibroze. Dobiveni rezultati su pokazali da TGF- β 1 potiče ekspresiju različitih fibroznih gena: α -SMA, ED-A FN, PALLD, COL1A1, ARHGDI1, IGFR-1, THBS-1, PAI-1, TIMP-1, CCL11 i IL-6. Inhibicija fosforilacije p38 MAPK specifičnim inhibitorom u potpunosti inhibira nizvodnu signalnu kaskadu preko inhibicije MAPKAPK-2 kinaze što je dovelo do smanjene ekspresije gena: PALLD, α -SMA, THBS-1, PAI-1, TIMP-1 i CCL11. Također, TGF- β 1-posredovana kontrakcija fibroblasta uzgojenih u kolagenskom gelu je ovisna o aktivaciji/fosforilaciji p38. Inhibicija signalnog puta p38 MAPK mogla bi predstavljati novi terapijski pristup u liječenju Dupuytrenove kontrakture, posebno u prevenciji recidiva nakon operativnog zahvata.

SUMMARY

Dupuytren's disease (DD) is a benign proliferative disorder of palmar fascia, characterized by transformation of connective tissue in the palm. The aetiology of DD is not completely understood. Similar to other fibrosis, fibroblasts/myofibroblasts proliferation and their involvement in excess collagen and extra-cellular matrix deposition together with contraction are hallmark of this disease. In addition, myofibroblasts may even be considered an active part of the innate immune system and display many functions and receptors in common with macrophages. On that way they can (have the ability) recruit and stimulate the innate and adaptive immune response to amplify fibrosis. Surgical intervention is the first line of treatment, and cannot ensure complete healing neither high recurrence rates. Better understanding of DD pathogenesis is crucial for discovery of novel diagnostic and therapeutic targets. Among fibrogenic cytokines, TGF- β 1 has been implicated as a key stimulator of myofibroblasts activity and fascial contraction in Dupuytren's disease. TGF- β 1 is known to signal through Smad proteins but can also activate Ras and Erk, Rho GTPase and JNK as well as p38 MAP kinase. Inhibition of p38 has been reported to reduce pulmonary and renal fibrosis in animal models. MK2 kinase which is a substrate for p38, play a critical role in cell cycle regulation, actin remodeling, cell development, migration and cytokine/chemokine production. Furthermore, it plays an important role in the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. The role of p38 MAPK signalling pathway in DD was assessed in this study on the primary cell culture model. Obtained results reveal that treatment of cells by TGF- β 1 successfully induced activation of various fibrotic genes, *i.e.* α -SMA, ED-A FN, PALLD, COL1A1, ARHGDI, IGFR-1, THBS-1, PAI-1, TIMP-1, CCL11 and IL-6. Moreover, inhibition of p38 phosphorylation inhibited phosphorylation of MAPKAPK-2 kinase that led to decreased expression of fibrotic genes PALLD, α -SMA, THBS-1, COL1A1, ED-A FN, PAI-1, TIMP-1 and CCL11. In line with these results, we managed to measure increased fibroblast contractility upon TGF- β 1 treatment and decreased contractility of cells upon inhibition of p38 phosphorylation. Inhibition of p38 MAPK signalling pathway may provide a novel therapeutic avenue for the treatment of Dupuytren's disease.

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Maro Bujak
Datum rođenja: 13. veljače 1982., Dubrovnik
Adresa prebivališta: Rubetićeve 25, Zagreb
Telefon: 091 545 3004
e-mail adresa: mbujak@irb.hr
Bračno stanje: oženjen, otac jednog djeteta

OBRAZOVANJE

Lipanj 2006. Upisao poslijediplomski doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu u Osijeku

Svibanj 2006. Diplomirao biologiju, smjer Molekularna biologija

Siječanj 2005.- veljača 2006. Izrada diplomskog rada na Institutu "Ruđer Bošković", naslova Dupuytrenova kontraktura: učinak citostatika 5-fluorouracila i njegovih derivata na primarne kulture stanica

2000. Upisao studij biologije, smjer Molekularna biologija na PMF-u, Zagreb

1996-2000. Pohađao Gimnaziju Dubrovnik, Dubrovnik

RADNO ISKUSTVO

Datum zaposlenja: 1.9.2006. – 5.4.2007.

Ustanova zaposlenja: Osnovna škola «Mokošica», srednja Medicinska škola Dubrovnik

Naziv radnog mjesta: prof. Biologije

Datum zaposlenja: 5.4.2007. – 1.2.2008.

Ustanova zaposlenja: Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Zavod za molekularnu medicinu

Naziv radnog mjesta: viši tehničar

Područje rada: Biomedicina

Datum zaposlenja: 1.2.2008. -

Ustanova zaposlenja: Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Zavod za molekularnu medicinu

Naziv radnog mjesta: znanstveni novak

Područje rada: Biomedicina

DODATNO OBRAZOVANJE I PROFESIONALNO USAVRŠAVANJE

D.Jurišić, S. Kraljević, S. Bratulić, **M. Bujak**, G. Karminski-Zamola, B. Žinić, Z. Stanec, K. Pavelić "Antiproliferative effects of three newly synthesised compounds on the cell cultures from the patients with Dupuytren's contracture". *6. hrvatski kongres plastične, rekonstrukcijske i estetske kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem*, Opatija, 6. - 11. listopada 2006.

S. Bratulić, D. Jurišić, **M. Bujak**, G. Karminski-Zamola, B. Žinić, K. Pavelić, S. Kraljević "Biological effects of three newly synthesized compounds on the cell cultures from the patients affected by dupuytren's contracture". *EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting*, 15.- 17.06. 2006, Cavtat, Hrvatska

Interdisciplinary scientific conference of the European Cooperation in Scientific and Tehnical Research (COST) - "Oxygen, Stress & Lipids" ,26.-27. October 2007., Dubrovnik, Croatia

Applications of Functional Genomics to Biomedical Research, workshop, 20.-23.6.2008., Cavtat, Hrvatska

HDIR-1 "From Bench to Clinic", First meeting with international participation, 11.11.2010, Zagreb, Croatia

M. Bujak, I. Ratkaj, M. Baus Lončar, D. Jurišić, K. Pavelić, S. Kraljević Pavelić Importance of p38 MAPK pathway in development of Dupuytren's disease. FEBS3+Meeting: From molecules to life science and back, Opatija, 13.-16. lipanj 2012

S. Vučimić, A. Horvatić, **M. Bujak**, K. Mišković, M. Cindrić, M. Baus Lončar. Proteomic profiling of intestinal proteins in TFF2 deficient mice. HDIR-2 "From Bench to Clinic", Second meeting with international participation, October.2012, Zagreb, Croatia

STIPENDIJA

Primao stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta

OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETICIJE

Materinji jezik: Hrvatski

Strani jezici: Engleski

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETICIJE

Rad na računalu (sučelje MS Windows)

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

Ratkaj Ivana, **Bujak Maro**, Jurišić Davor, Baus Lončar Mirela, Bendelja Krešo, Pavelića Krešimir, Kraljević Pavelića Sandra. **Microarray Analysis of Dupuytren's Disease Cells: The Profibrogenic Role of the TGF- β Inducible p38 MAPK Pathway.** Cell Physiol Biochem (2012) 30: 927-942.

Kraljević Pavelić, Sandra; Bratulić, Siniša; Hock, Karlo; Jurišić, Davor; Hranjec, Marijana; Karminski-Zamola, Grace; Žinić, Biserka; **Bujak, Maro**; Pavelić, Krešimir. **Screening of potential prodrugs on cells derived from Dupuytren's Disease patients.** // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 63 (2009) , 8; 577-585 (članak, znanstveni)

Šaban, Nina; **Bujak, Maro.** **Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs.** // *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 64 (2009) , 2; 213-221 (pregledni rad, stručni).

Sović, Irena; Stilinović, Vladimir; Kaitner, Branko; Kraljević Pavelić, Sandra; **Bujak, Maro**; Čuljak, Katarina; Novak, Predrag; Karminski-Zamola, Grace. **Novel substituted 1-iminoisoindoline derivatives; synthesis, structure determination and antiproliferative activity.** // *Journal of molecular structure.* 1006 (2011) ; 259-265 (članak, znanstveni).

Ostali radovi u drugim časopisima

Bujak, Maro.

Proteinski čipovi za predikciju jetrene fibroze i ciroze kod kronične infekcije hepatitisom B // *Medicina : glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka.* 45 (2009) , 3; 286-291

Poglavlja u knjizi

Bujak, Maro; Ratkaj, Ivana; Baus Lončar, Mirela; Spaventi, Radan; Kraljević Pavelić, Sandra. **Small interfering RNAs: heralding a new era in gene therapy** // *Gene Therapy - Developments and Future Perspectives / Chunsheng Kang (ur.).* Rijeka : InTech, 2011. Str. 71-92.

