

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

Srđan Vučinić

**PROTEOMSKI PRISTUP ISTRAŽIVANJU
MOLEKULARNIH MEHANIZAMA RAZVOJA
MAKULARNE DEGENERACIJE NA MODELU
ŠTAKORA IN VIVO**

Doktorski rad

Osijek, 2012.

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

Srđan Vučinić

**PROTEOMSKI PRISTUP ISTRAŽIVANJU
MOLEKULARNIH MEHANIZAMA RAZVOJA
MAKULARNE DEGENERACIJE NA MODELU
ŠTAKORA IN VIVO**

Doktorski rad predložen
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne
doktorske studije radi stjecanja akademskog stupnja
doktora molekularnih bioznanosti – modul biomedicina

Osijek, 2012.

Ova je disertacija izrađena na Institutu „Ruđer Bošković“ Zagreb, Zavodu za molekularnu medicinu, Laboratoriju za sistemsku biomedicinu, a u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog interdisciplinarnog studija „Molekularne bioznanosti“ Sveučilišta u Osijeku te pod vodstvom Doc. dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić u sklopu projekata MZOŠ “Uloga IGF2 i signalni putovi nizvodno u karcinomima pluća čovjeka“ (broj projekta 335-0000000-3532), suradnog međunarodnog projekta s FGCZ-Zurich, Švicarska - „Proteomic analysis of differentially expressed retinal proteins in macular degeneration” (ID: 843) i projekta HAZU „Molekularno profiliranje metastazirajućeg tumora dojke (voditelj, akademik Šime Spaventi).

Zahvala

Posebno se zahvaljem Prof. dr. sc. Božidaru Vojnikoviću bez čije stručnosti i podrške ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem mentorici Doc. dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić, na beskonačnom strpljenju i suradnji te osobito na konkretnim komentarima i idejama u pravim trenucima.

Zahvaljujem studijskom savjetniku Prof. dr. sc. Krešimiru Paveliću na podršci, konstruktivnim sugestijama i savjetima, kako tijekom poslijediplomskog studija tako i pri izradi doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem kolegama iz Centra za funkcionalnu genomiku (FGCZ) iz Zuricha, Peteru Gherigu i Ralphu Schlapbachu koji su pomogli u realizaciji važnog dijela ove disertacije u okviru zajedničkog projekta.

Nadalje, zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za sistemsku biomedicinu, Instituta Ruđer Bošković, i vodiitelju dr.sc. Mariu Cindriću, na pomoći i podršci pri izradi disertacije.

Osobito se zahvaljujem kolegicama Doc. dr. sc. Mireli Sedić i Aniti Horvatić, dipl. ing. na nesebičnoj tehničkoj, stručnoj i inoj pomoći prilikom izrade disertacije.

Veliko Hvala, mojoj obitelji, na podršci, razumijevanju i strpljenju.

Prijateljima, te naravno....

Wombatu



PROTEOMSKI PRISTUP ISTRAŽIVANJU MOLEKULARNIH MEHANIZAMA RAZVOJA MAKULARNE DEGENERACIJE NA MODELU ŠTAKORA IN VIVO

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Građa oka i mrežnice	2
1.2. Makularna degeneracija i faktori rizika	6
1.2.1. Rani stadij makularne degeneracije.....	8
1.2.2. Kasni stadij makularne degeneracije.....	9
1.2.2.1 Atrofični (suhi) oblik makularne degeneracije.....	9
1.2.2.2 Neovaskularni (mokri) oblik makularne degeneracije	10
1.3 Klinička slika bolesti.....	10
1.4. Metode dijagnosticiranja bolesti.....	11
1.4.1. Amslerov test.....	11
1.5. Metode kvantitativnog oslikavanja mrežnice (<i>engl. Quantitative Retinal Imaging</i>) 12	
1.6. Liječenje makularne degeneracije.....	15
1.7. Visokoprotodne metode analize u istraživanju molekularnih mehanizama bolesti	18
1.7.1. Uloga proteomike u razjašnjavanju molekularnih mehanizama	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. Model makularne degeneracije retine <i>in vivo</i>	22
3.1.1. Pokusne životinje	22
3.1.2. Metoda zračenja oka	22
3.1.3. Slikanje fundusa oka i eksplantacija mrežnica	23
3.2. Izolacija proteina iz tkiva mrežnica	23
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina u lizatu	24
3.3. DVODIMENZIONALNA GEL – ELEKTROFOREZA (2-DE)	26

3.3.1. Izoelektrično fokusiranje – IEF	26
3.3.1.1. Ekvilibracija trakica IPG.....	27
3.3.2. SDS-Poliakrilamidna gel - elektroforeza – (SDS-PAGE)	28
3.3.2.1. Bojanje gelova	29
3.3.2.2. Računalna analiza gelova i rezanje spotova.....	29
3.4. SPEKTROMetriJA MASA	30
3.4.1. Priprema uzoraka za analizu na MALDI – TOF/TOF spektrometru masa.....	32
3.4.2. Analiza spektrometrom masa MALDI TOF/TOF	33
3.5. Identifikacija proteina uz pomoć baza podataka.....	33
3.6. Tekućinska kromatografija – analiza LC-MS/MS	34
3.6.1. Priprema uzoraka za analizu na spektrometru masa LTQ-FT (<i>engl.</i> Linear Trap Quadrupole-Fourier Transform)	34
3.6.2. Identifikacija proteina uz pomoć baza podataka.....	35
3.7. Bioinformatička obrada podataka	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Uspostava modela štakora za istraživanje makularne degeneracije	37
4.2. Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE).....	39
4.3. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize gelova 2-DE.....	41
4.5. Tekućinska kromatografija združena s masenom spektrometrijom (LC-MS).....	51
5. RASPRAVA	63
6. ZAKLJUČCI.....	69
7. LITERATURA	71
8. SAŽETAK	89
9. SUMMARY	90
10. ŽIVOTOPIS.....	91

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Sveučilište u Dubrovniku
Naziv studija Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

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

PROTEOMSKI PRISTUP ISTRAŽIVANJU MOLEKULARNIH MEHANIZAMA RAZVOJA MAKULARNE DEGENERACIJE NA MODELU ŠTAKORA IN VIVO

Srđan Vučinić, dr.vet.med.

Rad je izrađen Institutu Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb
Mentor: Dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić, doc.

Makularna degeneracija oka uzrokuje ireverzibilni gubitak centralnog vida u osoba starijih od 50 godina te je jedna od najčešćih uzročnika sljepoće u ljudi starije životne dobi. Nastanak makularne degeneracije vezan je uz niz čimbenika poput nasljedne predispozicije, životne dobi te UV-zračenja. U sklopu ovog istraživanja uspostavili smo animalni model na štakoru za proučavanje makularne degeneracije. Pokusnim zračenjem oka štakora uz pomoć zraka UVA i UVB pratili smo molekularne mehanizme nastanka degeneracije mrežnice na razini proteoma uz pomoć metoda dvodimenzionalne-gel elektroforeze te tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom, te bioinformatičkom analizom.

Broj stranica: 94

Broj slika: 10

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 138

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: štakor, makularna degeneracija, proteomika, 2-DE, tekućinska kromatografija, masena spektrometrija

Datum obrane: 29. lipnja 2012.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr.sc. Božidar Vojniković, red.prof.**
2. **Dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić, doc.**
3. **Dr.sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik**

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb. (u doktorskom radu treba dodati: Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14; Sveučilištu u Rijeci, Riječke rezolucije 7; Sveučilištu u Splitu, Livanjska 5 i Sveučilištu u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer Osijek
Institute Ruđer Bošković, Zagreb
University of Dubrovnik
Title of postgraduate study

PhD thesis

Scientific Area: Biomedicine and health
Scientific Field: Basic Medical Sciences

PROTEOMIC APPROACH TO MOLECULAR MECHANISMS OF DEVELOPMENT OF MACULAR DEGENERATION IN RAT MODEL IN VIVO

Srđan Vučinić, DVM

Thesis performed at *Ruđer Bošković Institute*, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb
Supervisor: **PhD. Sandra Kraljević Pavelić, doc.**

Macular degeneration is the leading cause of irreversible central vision loss in humans over 50 years of age and is one of the leading causes of blindness in elders. Development of macular degeneration involves a variety of factors including hereditary predisposition, age and radiation. As a part of presented study, the rat animal model was established. Animal eyes were irradiated with UVA and UVB rays to determine the molecular mechanisms underlying retinal degeneration on the proteome level by using large-scale proteomics methods (two dimensional gel-electrophoresis and liquid chromatography combined with mass spectrometry and bioinformatic analysis).

Number of pages: 94
Number of figures: 10
Number of tables: 18
Number of references: 138
Original in: Croatian

Key words: rat, macular degeneration, proteomics, 2-DE, liquid chromatography, mass spectrometry

Date of the thesis defense: 29. June 2012.

Reviewers:

1. **PhD Božidar Vojniković, Full Professor**
2. **PhD Sandra Kraljević Pavelić, Assistant Professor**
3. **PhD Neven Žarković, Senior Research Scientist**

Thesis deposited in:

National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb. (in Ph.D. Thesis additionally: University of Zagreb, Trg maršala Tita 14; University of Rijeka, Riječke rezolucije 7; University of Split, Livanjska 5 i University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3).

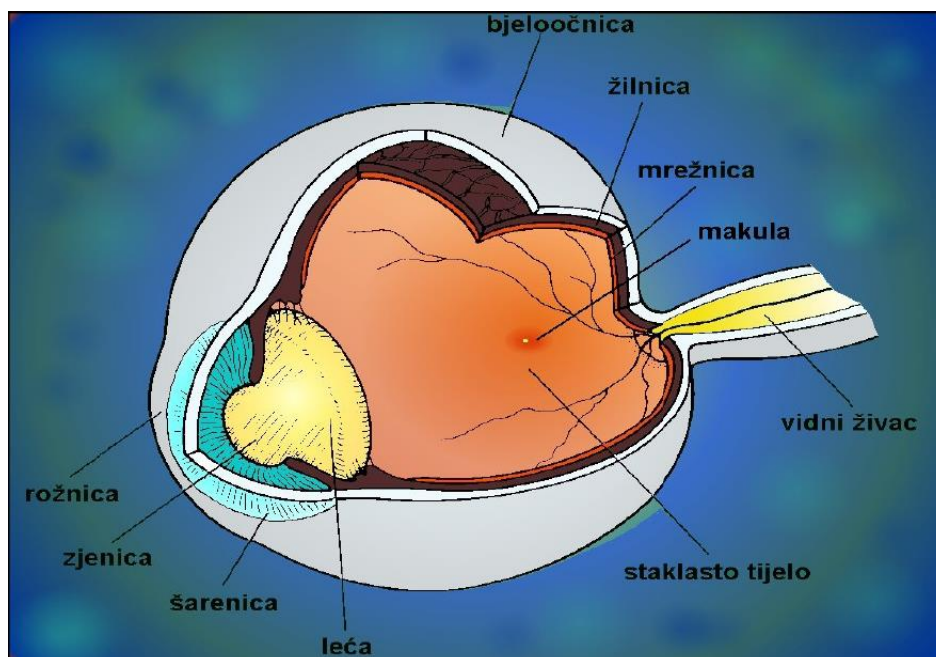
1. UVOD

Starenje je nepovratno mijenjanje ili postepeni gubitak funkcija organa i organskih sustava u ljudskom organizmu pa je starenju tako podložno i oko. Oko je osobito pogodan organ za proučavanje starosnih pojava, možemo ga promatrati izravno inspekcijom, bez invazivnih metoda. Jedna od takvih pojava je staračka mrena za koju se ne zna je li fiziološki fenomen starenja ili posljedica patološkog procesa. Isto bi mogli reći i za jednostavni glaukom tj. povećanje očnog tlaka u kasnim tridesetim i početkom četrdesetih godina života čije vrijeme nastanka nedvojbeno upućuje na to da se barem djelomično radi o posljedici senilnih promjena u komornom kutu oka. Najimpresivnija je bolest makularna senilna degeneracija koja se manifestira propadanjem neuralnih elemenata mrežnice na mjestu tzv. žute pjega. Žuta pjega predstavlja mjesto najjasnijeg vida. Niti jedan drugi dio mrežnice nema sposobnost registriranja tako oštre slike kao žuta pjega. U staračkoj degeneraciji makule na mjesto odumrlih stanica štapića i čunjića dolazi nefunkcionalno vezivno tkivo i talože se organske soli. Time taj dio mrežnice postaje nefunkcionalan, a pacijent zamjećuje kako je fiksirana slika u centru nejasna. Bolest je progresivna i napreduje različitom brzinom, dovodeći do znatnog gubitka oštine vida ali nikada do sljepoće. Liječenje je vrlo teško. Makularna degeneracija je porastom udjela starijeg stanovništva postala osobito aktualan problem. Prema nekim istraživanjima, od nje boluje 20% osoba starijih od 65 godina, te čak 37% osoba iznad 75 godina.

S obzirom na činjenicu da je makularna degeneracija veliki problem današnjice za koji ne postoji adekvatna terapija, u ovoj je doktorskoj disertaciji provedena globalna analiza ukupnih proteina mrežnice oka štakora u svrhu analize i objašnjenja molekularnih mehanizama koji vode u degeneraciju mrežnice. Ovakvo istraživanje nije objavljeno u znanstvenoj literaturi i njegovi rezultati značajno doprinose rasvjetljavanju mehanizama bolesti makularne degeneracije kao i otkriću novih proteinskih biljega koji bi se mogli koristiti u dijagnostičke i/ili terapijske svrhe.

1.1. Građa oka i mrežnice

Oko je visoko specijaliziran organ za vid osjetljiv na svjetlosni podražaj. Uz pomoć oka moguće je određivanje oblika, jačine svjetla i boje odbijene od predmeta. Oko se sastoji od optičkog sustava, živčanih elemenata, te pratećih i potpornih elemenata. Vanjsku ovojnicu očne jabučice čine relativno tvrdi bijeli vanjski sloj (*lat. sclera*, bjeloočnica), koji je pokriven tankom opnom (konjuktivom) i prozirna rožnica (*lat. cornea*). Srednju ovojnicu oka čine žilni sloj ili uvea kojeg čine žilnica (*lat. choroidea*), cilijarno tijelo (*lat. corpus ciliare*) i šarenica (*lat. iris*). Unutarnju ovojnicu oka čini mrežnica (*lat. retina*) u kojoj se nalaze živci koji reagiraju na svjetlo i krvne žile koje ih prehranjuju (slika 1). Najosjetljiviji dio mrežnice je makula promjera 1-2 mm (*lat. macula lutea*, žuta pjega) koja se sastoji od više stotina međusobno povezanih živčanih završetaka. Žuta je ime dobila zbog žućkaste boje koju joj daje pigment lutein, važan za zaštitu od jarkog svjetla i ultraljubičastih zraka. Mrežnica pretvara sliku u električne impulse koje vidni živac prenosi u mozak.

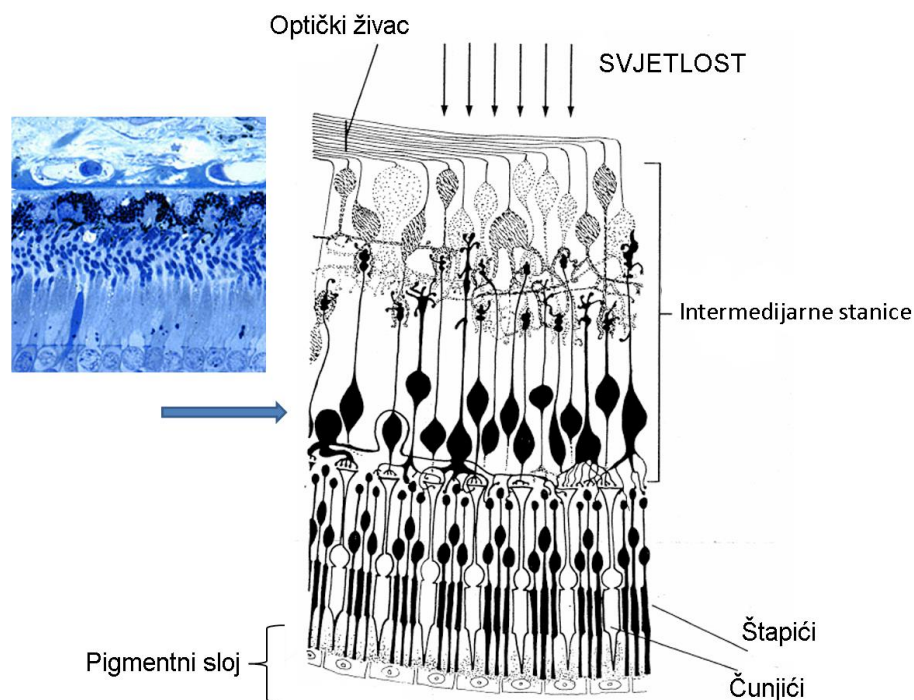


Slika 1. Građa oka (preuzeto iz: Lončarek: Bilješke za udžbenik oftalmologije za stomatologe, 2008.)

Vanjski sloj mrežnice sačinjava pigmentni epitel, ispod kojeg se nalazi neuralni sloj (slika 2). Pigmentni epitel čini jedan sloj cilindričnih stanica u koje ulaze vrhovi fotoreceptora. Bazalna ploha cilindričnih stanica pigmentnog epitela prijanja uz Bruchovu membranu, a apikalna ploha ima brojne produžetke dvojakog tipa: tanke mikrovile i šuplje cilindrične izdanke u koje ulaze vrhovi fotoreceptora. Stanice pigmentnog epitela su izuzetno važne za mrežnicu jer vrše niz vitalnih funkcija koje uključuju:

- Sekreciju signalnih molekula ATP, fas-liganda (fas-L), faktora rasta fibroblasta (FGF-1, FGF-2, FGF-5), transformirajućeg faktora rasta- β (TGF- β), inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF-1), neurotrofnog faktora cilija (CNTF), vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF), lens epitelnog faktora rasta leće (LEDGF), interleukine, inhibitore matriks-metaloproteinaza tkiva itd. iz oka prema tijelu/krvi (Strauss, 2005); regularnu fagocitozu fotoreceptorskih stanica koje odumiru zbog svjetlosno-oksidativnog oštećenja; za potpuno obnavljanje vanjskog sloja fotoreceptora potrebno je 11 dana (Kevany i Palczewski, 2010).
- Transport iona (Na^+ , K^+ , Cl^- i Ca^{2+}) i nutrijenata (vitamin A, omega-3 masne kiseline i glukoza) iz krvi u mrežnicu (Marmorstein, 2001).
- Imunomodulatornu funkciju obavlja pigmentni sloj mrežnice koji štiti unutarnji dio oka/mrežnice od imunoloških reakcija u tijelu/krvi. U tu svrhu, pigmentni sloj može izlučivati citokine IL-8, kompletni faktor H i monocitni protein kemotaksije 1 (Chen i sur., 2007; Austin i sur., 2009) kao i aktivirati receptore MHC, TLR i TNF- α receptor (Liversidge i sur., 1993; Kindzelskii i sur., 2004; Oh i sur., 1999).
- Apsorpcija svjetlosti (stanice pigmentnog sloja sintetiziraju melaninska zrnca koja upijaju raspršeno svjetlo) (Beatty i sur., 1999).

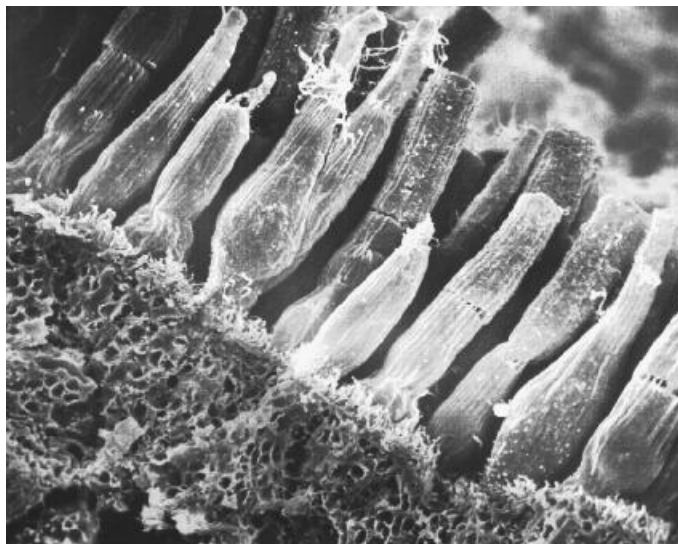
Neuralni sloj mrežnice čine stanice fotoreceptora, bipolarne stanice, vodoravne stanice, amakrine stanice, Müllerove stanice i ganglijske stanice. Fotoreceptori pretvaraju svjetlosni podražaj u električni signal.



Slika 2. Histološki presjek mrežnice

(lijevo: slika mrežnice dobivena svjetlosnim mikroskopom; desno: shematski prikaz mrežnice).

Postoje dvije vrste fotoreceptora, štapići i čunjići (slika 3). Štapići su tanke, izdužene stanice ($50 \times 3 \mu\text{m}$) izuzetne osjetljivosti na svjetlo koje se aktiviraju kod slabog svjetla. Unutrašnji odsječak štapića ima metaboličku funkciju, te sadržava organele potrebne za biosintezu i stvaranje energije. Vanjski odsječak štapića reagira na svjetlo, a sastoji se od brojnih (600-1000) plosnatih membranskih diskova koji su samostalne jedinice tj. ne nastavljaju se na staničnu membranu. U membranskim diskovima nalazi se vidni pigment rodopsin.



Slika 3. Slika štapića (štapići (*engl. rods*) i čunjića (*engl. cones*) dobivena elektronskim mikroskopom (Omikron[©] Photo Researchers, Inc)

Pigment rodopsin sastoji se od aldehida vitamina A (retinala) koji je vezan za bjelančevinu opsin. Kada svjetlo dođe do molekule rodopsina, retinal mijenja svoju izoformu ; iz 11-*cis* oblika prelazi u *trans* oblik. Retinal se pri tome odvaja od opsina pri čemu pigment gubi boju. Takav izbledjeni pigment povećava propusnost kalcija u membranskim diskovima i pospješuje difuziju kalcija u unutarstanični prostor vanjskog odsječka fotoreceptora. Kalcij nadalje, smanjuje propusnost stanične membrane za ione natrija te izaziva hiperpolarizaciju stanice. Zatvaranje natrijevih kanala uzrokuje električni signal koji se širi u unutrašnji odsječak i u susjedne stanice. U sljedećem stadiju dolazi do regeneracije vidnog pigmenta.

Čunjići (60 x 1,5 μm) se od štapića razlikuju građom vanjskog odsječka koji se sastoji od membranskih diskova koji nisu slobodni i koji nastaju kao uvrnuća stanične membrane, s kojom su trajno povezani. Tri vrste čunjića sadrže različite fotopigmente, jodopsine, koji su najosjetljiviji u crvenom, zelenom ili plavom dijelu vidnog spektra (Junqueira i sur., 2005). Čunjići su osjetljivi samo na vrlo jako svjetlo, te omogućuju bolju vidnu oštrinu nego štapići. S obzirom kako je u centru makule plitka udubina tzv. fovea (*lat. fovea centralis*) gdje je oštrina vida najveća, ne čudi što se tu nalaze čunjići u koncentraciji od 100 000 do 324 000 čunjića/mm², dok štapića uopće nema (Curcio i sur., 1990).

1.2. Makularna degeneracija i faktori rizika

Makularna degeneracija (*engl.* age-related macular degeneration, AMD) vodeći je uzrok slabog vida i sljepoće kod starije populacije u svijetu (Klaver i sur., 1998; H. Buch i sur., 2004; Friedman i sur., 2004). Makularna se degeneracija manifestira propadanjem neuralnih elemenata mrežnice na mjestu žute pjege (mjesto najjasnijeg vida). U staračkoj makularnoj degeneraciji odumrle stanice štapića i čunjića zamjenjuju se nefunkcionalnim vezivnim tkivom uz taloženje organskih soli. Time taj dio mrežnice postaje nefunkcionalan, a pacijent zamjećuje kako je fiksirana slika u centru nejasna. Čini se da bi uzrok tomu mogla biti smanjena otpornost pigmentnih stanica mrežnice na svjetlost i nemogućnost kompenzacije oksidativnog stresa (oštećenja) stanica (Strauss, 2009). Naime, poznato je kako već u ranoj životnoj dobi tijekom fagocitoze i regeneracije fotoreceptora dolazi do nakupljanja lipofuscina koji smanjuje otpornost pigmentnog sloja mrežnice na svjetlost (Boulton i sur., 2001; Schutt i sur., 2000). Bolest je progresivna i napreduje različitom brzinom, dovodeći do znatnog gubitka oštine vida ali nikada do sljepoće. Liječenje je vrlo teško.

Iako postoje mnogobrojni čimbenici nastanka makularne degeneracije, najčešće se spominju dob, genetska predispozicija, izloženost suncu i zračenju, pušenje, hipertenzija, oksidativni stres, visoka razina kolesterola te pretilost. Tako primjerice, 20% pacijenata u dobi od 65 - 75 godina imati će neke naznake razvoja simptoma makularne degeneracije. Učestalost raste do 40% kod pacijenata u dobi 75 - 85 godina. Bolest je također učestalija u žena te u pripadnika bijele rase (Eong i sur., 2008). Nadalje, geni za sustav komplementa faktor H (CFH) i faktor B (CFB) povezani su s rizikom za razvoja makularne degeneracije (Klein i sur., 2005). CFH je uključen u inhibiciju upalnog odgovora posredovanog s C3b (s alternativnim putem komplementa) i ponašajući se kao kofaktor za cijepanje C3b u njegov neaktivni oblik C3bi, i za slabljenje aktivnog kompleksa koji tvore s C3b i faktorom B (Maller i sur., 2006). C-reaktivni protein i polianionski površinski biljezi kao glukozaminoglikani pojačavaju sposobnost faktora H da inhibira komplement. Mutacija faktora CFH (Tyr 402His) reducira afinitet CFH za CRP i vjerojatno mijenja sposobnost faktora H da prepozna specifični glikozaminoglikan

(Hageman i sur., 2005). Ova promjena rezultira smanjenom sposobnošću CFH regulacijom komplementa na kritičnim površinama kao što je specijalna membrana na stražnjoj površini oka. Ovo dovodi do pojačanog upalnog odgovora na makuli. Kasni stadij makularne degeneracije razvija se u 50 % osoba koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu, nasuprot 12% osoba koje nemaju makularnu degeneraciju u obitelji.

Posebnu skupinu rizika za razvoj makularne degeneracije čine osobe izložene suncu i zračenju. Ljudsko oko naime, stalno je izloženo sunčevom i umjetnom svjetlu, odnosno zrakama UVB (295–320 nm) i zrakama UVA (320–400 nm), te vidljivom svjetlu (400–700 nm). Iako je svjetlo neophodno za vid, može i oštetiti oko. Postoje tri vrste oštećenja uzrokovanih zračenjem: fotomehaničko, fototermalno i fotokemijsko oštećenje. Fotomehaničko oštećenje nastaje kod kratkotrajnih visokih iradijacija (reda veličine MW/cm² do TW/cm²), pri čemu melanosomi pigmentnog epitela velikom brzinom apsorbiraju zračenje što izaziva elektromagnetske prijelazne pojave ili udarne valove (Glickman, 2002). Nastaju dugotrajna oštećenja pigmentnog epitela i fotoreceptora (Wu i sur., 2006). Fototermalna oštećenja nastaju prilikom apsorpcije energije zračenja u vibracijskim ili rotacijskim spektralnim područjima. Time se može povećati kinetička energija, što se očituje povišenjem lokalne temperature. Termalne lezije nastaju pri povećanju temperature mrežnice za barem 10°C više od bazalne temperature mrežnice. Fotokemijska oštećenja nastaju prilikom apsorpcije zračenja kraćih valnih duljina vidljivog spektra ili valnih duljina ultraljubičastog zračenja (Wu i sur., 2006). Zbog apsorpcije takvog zračenja dolazi do stvaranja slobodnih radikala kisika i drugih vrsta slobodnih radikala, koji mogu reagirati s polimerima nezasićenih masnih kiselina uzrokujući lančanu reakciju peroksidacije lipida i time degradaciju membranskih struktura (Wiegand i sur., 1983; Hiramitsu i Armstrong, 1991). Budući da rožnica i leća apsorbiraju većinu UV-zračenja posebice u odraslih, fotokemijska oštećenja nastaju uglavnom zbog apsorpcije zračenja vidljivog dijela spektra, posebno plavog svjetla ($\lambda = 470$ nm) koje oštećuje fotoreceptore i stanice pigmentnog epitela (Gorgels i Norren, 1998). Međutim, mali dio UV-zračenja ipak može prodrijeti do mrežnice, gdje uzrokuje oštećenje fotoreceptora, posebno štapića (Busch i sur., 1999). Zbog stanjenja ozonskog sloja više UV-zračenja prodire do Zemlje, te dolazi do povećane izloženosti čovjeka. Neke studije pokazale su da ljudi koji su se tijekom života dugotrajno izlagali sunčevom

zračenju npr. poljoprivrednici i ribari, imaju povećanu incidenciju makularne degeneracije naspram onih koji su obavljali poslove u zatvorenim prostorima (Vojniković i sur., 2007). Svi ti čimbenici, kao i produljenje životnog vijeka ljudi, doprinose kumulativnom učinku štetnog djelovanja svjetla i UV-zračenja na mrežnicu, a time i na razvoj makularne degeneracije.

Za kraj, oksidativni stres i pušenje predstavljaju važnu grupu rizičnih faktora koji dovode do oštećenja mrežnice. Primjerice, pušenje duhana povisuje rizik razvitka makularne degeneracije 2-3 puta, te prestanak pušenja može biti jedan od najvažnijih faktora u prevenciji bolesti (Christen i sur., 1996). Prijašnje studije su potvrdile snažnu povezanost između pušenja i makularne degeneracije jer pušenje ima izrazito toksični učinak na retinu (Khan i sur., 2006).

Makularna degeneracija je porastom udjela starijeg stanovništva postala osobito aktualan fizički ali i psihički problem. Prema nekim istraživanjima, od nje boluje 20% osoba starijih od 65 godina, te čak 37% osoba u dobnoj skupini nakon 75 godina (Eong i sur., 2008). Makularna degeneracija klinički se manifestira u dva oblika: rani i kasni stadij.

1.2.1. Rani stadij makularne degeneracije

Makularna degeneracija u ranom stadiju prepoznaje se prvenstveno po žućkastim nakupinama na mrežnici, druzama (*engl.* drusen). U ranom stadiju bolesti dolazi do zadebljanja i gubitka normalnog ustroja Bruchove membrane, akumulacije lipofuksina u pigmentnom epitelu, te do stvaranja druzi. Najranije patološke promjene su pojava bazalnih linearnih depozita (*engl.* basal linear deposits, BlinL) i bazalnih laminarnih depozita (*engl.* basal laminar deposits, BlamD), (Green i Enger, 1993). BlamD sastoje se od proteina bazalne membrane i kolagena, a nastaju između bazalne i plazma membrane stanica pigmentnog epitela. BlinL su specifičniji za rani stadij bolesti, a nastaju u kolagenskoj zoni Bruchove membrane (Curcio i Millican, 1999). Druze pak možemo morfološki klasificirati kao tvrde (*engl.* hard) ili meke (*engl.* soft). Tvrde druze su male, žućkaste, točkaste nakupine promjera manjeg od 63 μm , a njihova prisutnost ne znači nužan rizik za razvoj MD jer se mogu pojaviti i kod zdravih ljudi. Za razliku od njih,

meke druze su raštrkane, bljeđe i veće, s nejasnim, zamućenim rubovima te su visoko specifične za rani stadij makularne degeneracije.

1.2.2. Kasni stadij makularne degeneracije

Kod kasnog stadija, klinički razlikujemo „suhi“ ili atrofični oblik makularne degeneracije i „mokri“ neovaskularni oblik. Smatra se kako makularna degeneracija nastaje progresivno u kontinuiranoj patogenezi iz atrofičnog „suhog“ oblika bolesti pa sve do neovaskularnog „mokrog“ oblika bolesti. Obično je teži gubitak vida povezan s „mokrim“ oblikom bolesti od kojeg u konačnici oboli oko 15% svih pacijenata s makularnom degeneracijom (Sunness, 1999).

1.2.2.1 Atrofični (suhi) oblik makularne degeneracije

Ovaj oblik bolesti, koji se često naziva i geografska atrofija, karakterizira progresivna degeneracija mrežnice, pigmentnog epitela, Bruchove membrane i žilnice, što za konačnu posljedicu ima gubitak vida. Patološke abnormalnosti javljaju se u makularnom i u perifernom dijelu mrežnice (Vojniković, 2007). Geografska atrofija nastaje kao posljedica atrofije mrežničnog pigmentnog epitela, koja pak uzrokuje gubitak fotoreceptora u središnjim dijelovima mrežnice, jer su fotoreceptori metabolički ovisni o stanicama pigmentnog epitela. Time dolazi do stanjivanja mrežnice i smanjenja oštine vida (Curcio i sur., 2000). Do atrofije pigmentnog epitela dolazi zbog smanjenja krvnog protoka u koriokapilarama, što je klinički dokazano kod pacijenata s ovim oblikom makularne degeneracije (Grunwald i sur., 1998).

1.2.2.2 Neovaskularni (mokri) oblik makularne degeneracije

Neovaskularni ili „mokri“ oblik prvi je puta opisao Pagenstecher 1875. godine pod nazivom horidioretinitis (Pagenstecher, 1875). Već 1905. godine Oeller opisuje i povezuje ovu bolest s makularnom degeneracijom i naziva je eksudativni (mokri) oblik senilne makularne degeneracije (Oeller, 1905). Ovaj oblik makularne degeneracije izaziva gubitak vida zbog abnormalnih krvnih žila koje rastu iz koriokapilara probijajući Bruchovu membranu, te mogu uzrokovati krvarenje i nakupljanje tekućine i proteina ispod makule, te konačno dovesti do nastajanja ožiljaka (Green, 1977). Za razliku od „suhog“ oblika makularne degeneracije neovaskularni oblik se klinički pojavljuje u svega 10-12 % oboljelih ljudi. Čimbenici nastanka bolesti isti su kao i kod suhog oblika bolesti : dob, pušenje, zračenje te genetska predispozicija. Neovaskularna makularna degeneracija javlja se kao klasična ili okultna. U klasičnoj formi krvne žile probijaju Bruchovu membranu, RPE i neuralnu mrežnicu, a javlja se u 12 % slučajeva neovaskularne bolesti (Oliver i sur., 2008). Klasična forma očituje se kao uzdignuće RPE, često praćeno subretinalnim lučenjem i taloženjem krvi i lipida (Gass, 1967). Okultna forma nastaje između RPE i Bruchove membrane, gdje gubitak integriteta RPE barijere rezultira subretinalnim edemom. Okultna forma javlja se u 85 % slučajeva neovaskularne makularne degeneracije (Penfold i sur., 2001).

1.3 Klinička slika bolesti

Uobičajeni klinički znakovi bolesti su zamućenje i/ili gubitak vida, iskrivljenje vida (metamorfopsija), nemogućnost razlikovanja boja (osobito tamnih od tamnih i svijetlih od svijetlih), spori oporavak vidne uloge nakon izloženosti jakom svjetlu te gubitak kontrastne osjetljivosti. Osobe oboljele od 'suhog', atrofičnog oblika makularne degeneracije često ne razvijaju ove simptome ili mogu zamijetiti stupnjeviti gubitak centralnog vida. Nasuprot tomu, osobe s „mokrim“, neovaskularnim oblikom makularne degeneracije često zamijete brzi nastup gubitka vida. Atrofični oblik bolesti se očituje

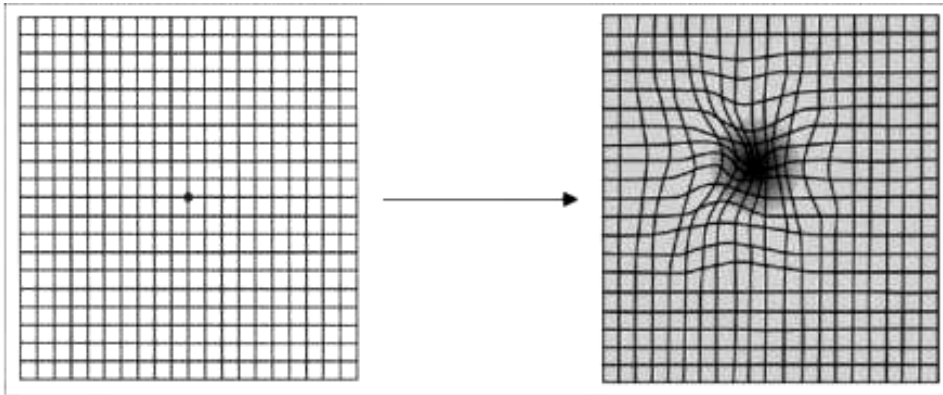
kao jasno ograničeno demarkacijsko područje smanjene retinalne debljine u odnosu na okolnu retinu te promjenom intenziteta boje koja omogućava bolju vizualizaciju horioidalnih krvnih žila (Sunness i sur., 2008). Također su moguće promjene u pigmentaciji (hipopigmentacija i hiperpigmentacija) u području atrofije. Veličina i koncentracija druzi raste do stupnja kada bolest postane toliko raširena da već krene resorpcija druzi. Atrofični oblik karakterizira i atrofija pigmentnog epitela te stanjenje i gubitak horiokapilara. Pojačana vaskularizacija oboljelog područja je najjednostavniji način otkrića promjene na fundusu oka koji se reflektira na daljnje stanjivanje pigmentnog epitela retine te umjeren gubitak vida (Lim, 2008). Uz pomoć fluoresceinske angiografije to se područje očituje hiperfluorescijom i podudara se s granicama atrofičnog područja. Neovaskularna senilna makularna degeneracija, "mokri" oblik uznapredovale senilne degeneracije makule, izaziva gubitak vida zbog abnormalnog rasta krvnih žila koje iz koriokapilarnog dijela probijaju Bruchovu membranu, uzrokujući krvarenje i nakupljanje tekućine i proteina ispod makule (Solomon i sur., 2007). Ako se ovakvo stanje ne liječi, krvarenje, nakupljanje tekućine i proteina, te stvaranje ožiljaka kao posljedica rasta tih krvnih žila konačno uzrokuje trajno i nepopravljivo oštećenje fotoreceptora, te brzi gubitak vidne oštrine.

1.4. Metode dijagnosticiranja bolesti

1.4.1. Amslerov test

Amslerov test (slika 4) je jedna od najjednostavnijih i najdjelotvornijih metoda za praćenje zdravlja žute pjege (makule). Amslerov test bazira se na korištenju pravilne mrežice s označenim centrom koju ispitanik promatra na udaljenosti od 30 - 40 cm svakim okom zasebno uz naočale za blizinu. Središnja crna točka koristi se za fiksaciju (tj. kao mjesto u koje ispitanik gleda). Kod gledanja u središnju crnu točku, osobe s normalnim vidom uočavaju kako su sve linije oko crne točke ravne i jednoliko razmještene, bez manjkavih ili prekobrojnih područja. Osobama kod kojih je očna pjega zahvaćena bolešću, kao kod makularne degeneracije, linije mogu izgledati savijene, iskrivljene i/ili se pojavljuje potpuni nedostatak pojedinih kockica (Goldstein i sur.,

2003). Nalaz iskrivljenja rešetke (metamorfopsija) može ukazivati na neovaskularizaciju žilnice. Takve promjene upućuju na oštećenja žute pjege i potrebu za kompletnim oftalmološkim pregledom (Loewenstein i sur., 2003). Slike koje gubitak centralnog vida kod makularne degeneracije ilustriraju crnom točkom nisu točne i ne daju pravu predodžbu o vrsti gubitka vida.



Slika 4. Amslerov test : Lijeva slika prikazuje uredan nalaz (normalan vid) dok desna slika prikazuje nemogućnost točne percepcije i fokusiranja slike (nalaz degeneracije makule)

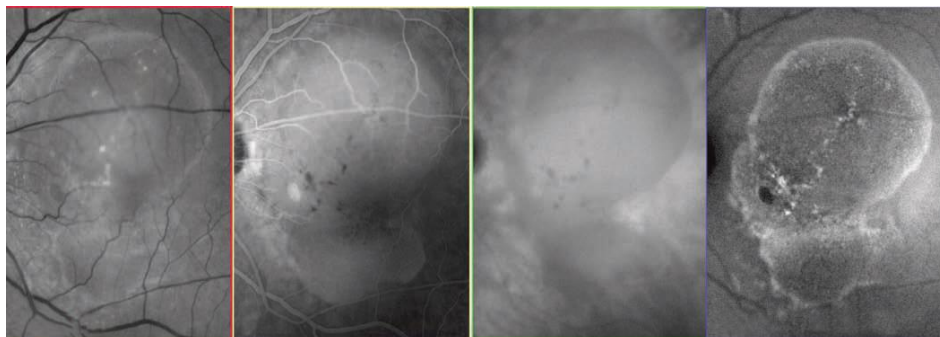
(<http://www.twoj-lekarz.com.pl/artykuly/badania-diagnostyczne/sadzisz-ze-masz-amd-wykonaj-test-amslera>)

1.5. Metode kvantitativnog oslikavanja mrežnice (engl. Quantitative Retinal Imaging)

Kvantitativne metode oslikavanja omogućavaju praćenje i vrednovanje broja druza, promjenu pigmenta na epitelu mrežnice kao i praćenje i vrednovanje lezija nastalih kod neovaskularne makularne degeneracije. Na osnovi praćenja različitih parametara i kvantifikacije fluorescencije moguće je pratiti razvoj bolesti i reakciju oboljelog dijela mrežnice na terapiju. U kvantitativne metode oslikavanja mrežnice ubrajaju se slikanje fundusa oka, optička koherencijska tomografija, fluoresceinska angiografija i

mikroperimetrija za praćenje funkcionalnih poremećaja u makularnoj degeneraciji. Najčešće se primjenjuju fluoresceinska angiografija te optička koherencijska tomografija (Esmaili i sur., 2008).

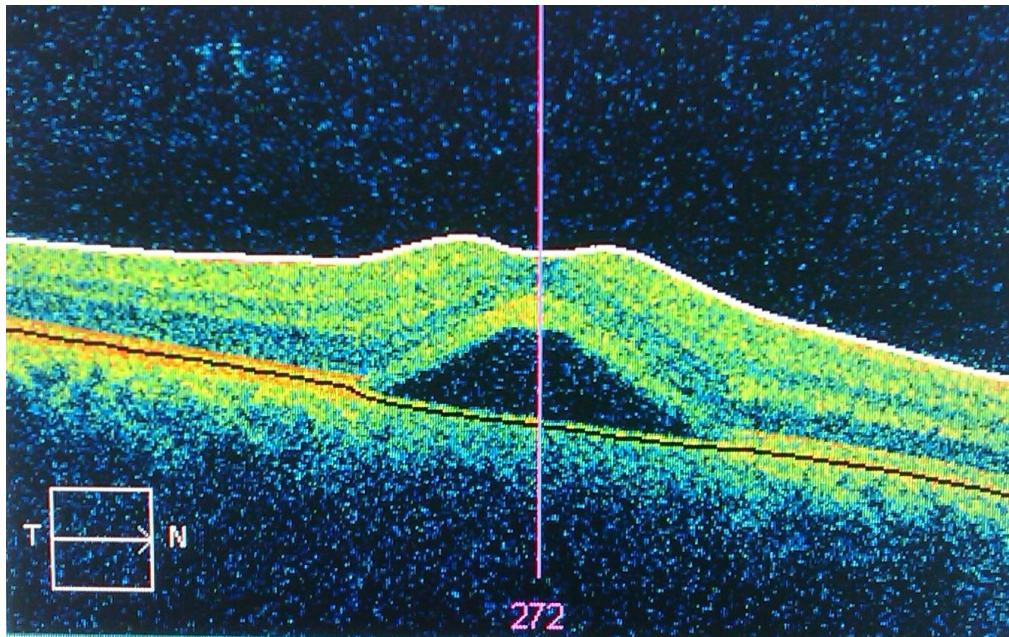
Fluoresceinska angiografija (slika 5) je tehnika ispitivanja krvotoka mrežnice uporabom metode bojenja. Uključuje (1) injekciju fluoresceina (*engl.* indocyanine green, ICG) u sistemski krvotok i (2) angiogram s obveznim bilježenjem fluorescencije emitirane nakon osvjetljavanja mrežnice plavim svjetlom valne duljine 490 nm. Za razliku od postojećih fluoresceinskih boja, fluorescein je pokazao puno veću specifičnost i omogućio bolju dijagnostiku kako atrofičnog tako i neovaskularnog oblika makularne degeneracije (Gisbert, 1998; Kanski, 2006). Fluorescencija se pojavljuje u pacijentovom urinu nakon 12-24h, uzrokujući zeleno-žutu obojenost. Preliminarne studije pokazale su i prednosti ove metode u terapiji makularne degeneracije fotokoagulacijom usporedno s primjenom inhibitora vaskularnih endotelnih čimbenika rasta (Oliver i sur., 2008).



Slika 5. Prednost korištenja fluoresceinskog angiograma u oboljelom oku (slika 1 - kontrola, slika 2 - fluoresceinska angiografija, slika 3 – indocijanin zelena, slika 4 – autoflorescencija) (preuzeto iz: Lim JI. Age-related macular degeneration, Informa Healthcare USA, 2008).

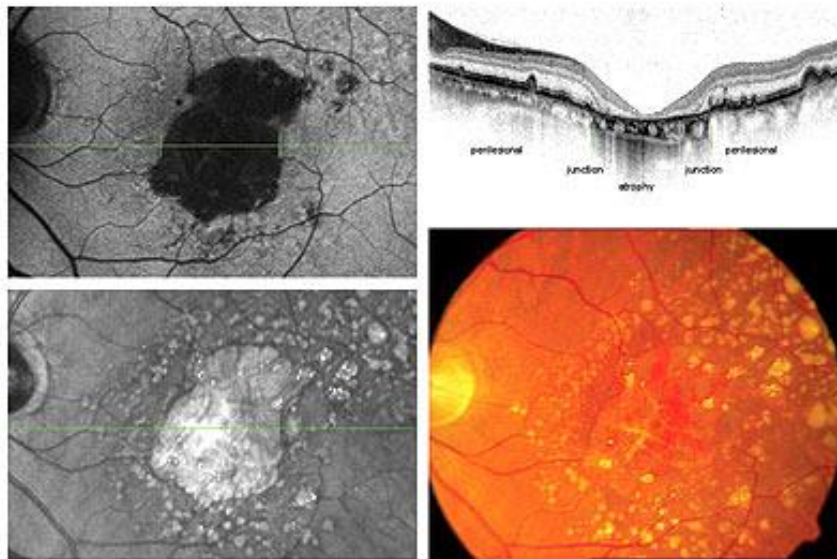
Optička koherencijska tomografija (slika 6) je metoda laserskog slojevnog snimanja mrežnice i vidnog živca. Omogućuje dokazivanje i kvantitativno praćenja odgovora oka na terapiju. Pri uporabi koristi se sloj infracrvenog svjetla dugih valnih dužina čime se omogućuje detaljni uvid u dublje slojeve ispitivanog područja oka uz trodimenzionalni prikaz biološkog uzorka. Optičku koherencijsku tomografiju trenutačno koristi većina

oftalmologa u dijagnostici i praćenju odgovora na liječenje bevacizumabom i srodnim lijekovima – inhibitorima vaskularnih endotelnih čimbenika rasta (VEGF) koji se ubrizgavaju u staklovinu. Također se može koristiti za procjenu rizika nastanka makularne degeneracije (Eichenbaum i Reichel, 2008).



Slika 6. Prikaz mrežnice uporabom optičke koherentne tomografije (<http://parkslopeeye.wordpress.com/tag/optical-coherence-tomography/>)

Autofluorescencija fundusa (slika 7) je metoda praćenja pigmenta lipofuscina u epitelnim stanicama mrežnice te predstavlja jedinstveni način praćenja funkcionalnosti makule. Lipofuscin je složena struktura fluorofora koji sadrže u sebi fluorescentni supstrat A2E sastavljen od dvije molekule aldehida vitamina A te jedne molekule etanolamina. Uz pomoć ove metode moguće je pratiti i postoperativni tijek bolesti. Fundoskopijom se mogu otkriti poremećaji pigmentacije ili krvarenje u području makule zahvaćenog oka; suprotno oko skoro uvijek pokazuje određeni stupanj poremećaja pigmentacije i druze u makuli (Singh i Chung, 2008). Drugi nalazi mogu biti odljuštena mrežnice, eksudacija lipida, atrofija tkiva i prožimanje makule ožiljcima.



Slika 7. Prikaz oboljele mrežnice uporabom autoflorescencije (Preuzeto s Interneta: osnsupersite.com)

1.6. Liječenje makularne degeneracije

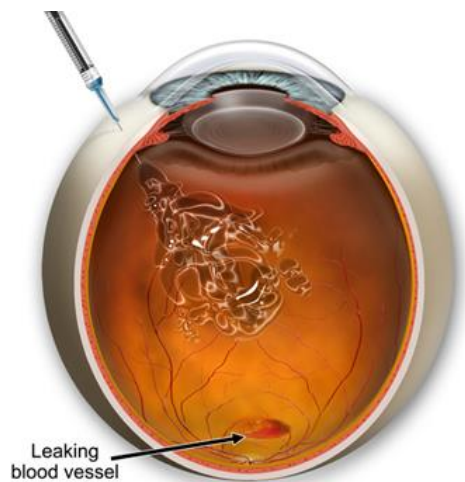
Jedinstvena terapija koja bi bila u mogućnosti u potpunosti izliječiti oboljele od makularne degeneracije još nije pronađena. Iako su testirane mnogobrojni terapijski pristupi, među najučestalije i najučinkovitije metode liječenja ubrajaju se laserska fotokoagulacija, fotodinamska terapija, terapija zračenjem te u novije vrijeme primjena lijekova protiv stvaranja krvnih žila.

Uvođenjem fotokoagulacije termalnim laserom (*engl.* thermal laser photocoagulation) osamdesetih godina prošlog stoljeća smanjena je brzina gubitka vida, ali samo kod neovaskularnog oblika bolesti te kod prisutnosti jasno izraženih granica lezija. Laserskim tretmanom uklanjaju se druze, no rizik za razvoj kasnog stadija bolesti ostaje nepromijenjen. Jedno istraživanje je pokazalo nedovoljnu učinkovitost ove terapije, budući da je samo 15 do 20 % pacijenata imalo lezije koje su se mogle tretirati ovim pristupom te je u 52% slučajeva došlo do ponovne pojave bolesti (Macular Photocoagulation Study Group, 1986).

Fotodinamička terapija (*engl.* photodynamic therapy, PDT) se zasniva na tome da se lijek verteporfin unese intravenozno te se nakon petominutne akumulacije lijek aktivira niskoenergetskim laserom valne duljine 689 nm, u trajanju od 83 sekunde (Husain i sur., 1999). Time se postiže privremeno zatvaranje koroidalnog neovaskularnog sustava u oku, te se terapija koristi za liječenje neovaskularnog oblika bolesti. Primjenom fotodinamičke terapije vid se stabilizirao kod 61 % tretiranih pacijenata, naspram 46 % koji su dobili placebo.

Zračenje, odnosno terapija zračenjem, može inducirati programiranu smrt stanice te modificirati čimbenike rasta koji potpomažu procese neovaskularizacije, kao i sam imunološki odgovor. Čimbenici koji utječu na određivanje primarne doze terapije su već postojeće mikroangiopatije, dijabetes te prethodno primljene kemoterapija. Primjena zračenja u dozi od 20 Gy pokazala se učinkovitom u smanjenju lezija i gubitka vida. Kombinirana terapija s fotodinamičkom terapijom te primjenom VEGF injekcija pojačava terapijski učinak ove metode terapije makularne degeneracije.

Od svih metoda najučinkovitijom se pokazala terapija novim lijekovima, nazvanim anti-angiogeni lijekovi ili anti - VEGF lijekovi (od *engl.* anti-Vascular Endothelial Growth Factor). Ovi agensi mogu uzrokovati regresiju abnormalnih krvnih žila i poboljšati vid ubrizgavanjem u staklovinu oka (slika 8). Meta prvog takvog lijeka generičkog naziva pegaptaniba, bio je VEGF, protein koji sudjeluje u angiogenezi. Terapijom s pegaptanibom vid je stabiliziran kod 70 % pacijenata, naspram 55 % koji su primili placebo (Gragoudas i sur., 2004). Nakon toga razvijen je lijek ranibizumab, fragment monoklonalnog antitijela koji svojim vezanjem inhibira sve forme VEGF. Ovim lijekom ne samo da je spriječen daljnji gubitak vida kod 95 % pacijenata naspram 62 % u placebo grupi, nego je došlo i do njegovog poboljšanja kod 34 % pacijenata, naspram 5 % iz placebo grupe (Rosenfeld i sur., 2006). Injekcije mogu biti umjereno bolne i obično zahtijevaju nekoliko ponavljanja u razmaku od mjesec dana. Ovi terapeutici poznati su pod različitim zaštićenim imenima poput Lucentis (ranibizumab), Avastin (bevacizumab), te Macugen (pegaptanib). Iako je terapija lijekovima koji djeluju na zaustavljanje angiogeneze dala dobre rezultate, potraga za lijekom još uvijek se nastavlja, budući da sve navedene terapije nisu postigle visoku specifičnost u suzbijanju patoloških procesa niti trajno poboljšanje vida oboljelih osoba.



Slika 8. Ubrizgavanje anti-angiogenih lijekova u staklovinu oka (izvor: <http://www.seewithlasik.com/docs/macular-degeneration-treatments.html>)

Razvojem novih tehnologija i mehanizama prevencije i terapije bolesti omogućiti će se bolji i kvalitetniji život ljudi. Kako je zdravlje oka od velike važnosti za normalan život pojedinca tako se pojavila i potreba za novim mogućnostima rane dijagnostike i/ili terapije makularne degeneracije. Novi terapijski pristupi u liječenju makularne degeneracije poput terapije usmjerene na angiogenezu, terapije inhibitorima za receptor tirozin kinazu ili gensko liječenje degeneracije (Rasmussen i sur., 2001), već sada pridonose ciljanoj i personaliziranoj terapiji.

Tako su primjerice, Reich i Tolentino (Reich i sur., 2003; Tolentino i sur., 2004) koristili male interferirajuće molekule RNA (*engl.* small intrferenig RNA, siRNA) za inhibiciju VEGF oboljelih od makularne degeneracije koja se pokazala dosta učinkovitom. Studija nije pokazala nikakve post-aplikacijske, kako lokalne tako i sistemske poremećaje, te je trenutno u kliničkoj fazi ispitivanja. Novija studija na miševima također je pokazala da je siRNA usmjerena na inhibiciju VEGF-R1 (receptora 1 za ligand VEGF) potencijalan vid terapije ove bolesti (Shen i sur., 2006). Na žalost, još uvijek se ne zna mnogo o učincima molekula siRNA na organizam u cjelini, kao niti o njihovoj potencijalnoj mutagenosti. Slično, u prekliničkim ispitivanjima lijek iz klase inhibitora VEGF, inhibitor PTK787, pokazao je sposobnost inhibicije retinalne neovaskularizacije na modelu miša te zbog

mogućnosti aplikacije peroralnim putem sve se češće spominje kao mogući vid terapije ove bolesti (Ozaki i sur., 2000).

1.7. Visokoprotodne metode analize u istraživanju molekularnih mehanizama bolesti

Razvoj novih metoda i tehnologija zadnjih desetljeća značajno utječe na razvoj temeljnih, i primijenjenih biomedicinskih istraživanja. Osobito je velik utjecaj imao razvoj i standardizacija metode sekvencioniranja nukleinskih kiselina što je po prvi puta omogućilo kvalitativni pomak od redukcionističkog istraživanja živih procesa ka sveobuhvatnom pristupu izučavanja određenih stanja u organizmu. Uslijedio je razvoj transkriptomike, tj. sustavne analize aktivnosti svih gena u organizmu, a potom i proteomike – sustavne analize ekspresije proteina pod specifičnim uvjetima, uključujući njihovu separaciju, identifikaciju i karakterizaciju (Kraljevic Pavelic i Pavelic, 2009).

Danas se primjerice, sve češće provodi analiza genoma oboljelih za utvrđivanje polimorfizama (*engl.* single nucleotide polymorphisms, SNP) uz pomoć čipova. Polimorfizmi u DNA predstavljaju promjenu jednog para nukleotida u genu koji onda utječu na različitu funkciju istoga gena. Pri tome nastaju alternativni aleli u zdrave individue. Polimorfizmi su bogati izvor genetske varijabilnosti u samome genomu i javljaju se jednom na svakih 300 parova baza (Lander 1996; Chakravartić 1999) te se sve više povezuju s predispozicijom nastanka bolesti i reagiranja na terapiju. Tako su primjerice kod oboljelih od makularne degeneracije utvrđeni polimorfizmi u genu apolipoprotein E (APOE) i komplement-faktoru H (Losonczy i sur., 2011; Martínez-Barricarte i sur., 2012). Nadalje, veliki broj studija sve više koristi čipove za analizu poznatih polimorfizama u oboljelih od makularne degeneracije. Tako je primjerice Francis pokazao kako polimorfizmi u genima za komplement faktor H, VEGF, receptor za VEGF FLT1 i komplement 3 utječu na ishod terapije oboljelih s lijekom ranibizumabom (Francis, 2011).

Tehnologija mikročip analize korištena je i za analizu ekspresije gena tijekom patogeneze makularne degeneracije. Primjerice, studija praćenja sveukupne genske ekspresije u mrežnici preminulih donora (adolescenata i starije populacije) ukazala je na razliku u

ekspresiji 24 od ispitanih 2400 gena između ove dvije grupe ispitanika (Yoshida i sur., 2002).

Slično je pokazano kako se ekspresija gena u leukocitima mijenja kod oboljelih od neovaskularnog oblika makularne degeneracije te autori studije predlažu kako bi se ekspresija gena u tim stanicama mogla koristiti kao biljeg za ovaj oblik bolesti (Lederman i sur., 2010).

Usprkos izuzetnoj važnosti za personaliziranu medicinu i iznalaženje novih biljega bolesti, molekularni procesi koji se odvijaju u organizmu ne mogu se objasniti samo uz pomoć analize statusa gena i njihove ekspresije, nego su ti procesi prije svega vezani za genske produkte, proteine.

1.7.1. Uloga proteomike u razjašnjavanju molekularnih mehanizama

Proteini su biološke molekule neophodne za odvijanje procesa unutar stanice. Sveukupni komplet proteina kojeg stanica eksprimira naziva se proteom (*engl.* proteome, *protein complement of the genome*). Određivanje i analiza proteomskog profila stanica ili tkiva stoga, može služiti kao dijagnostički biljeg, biljeg za točno utvrđivanje razvoja/faze bolesti ili za predviđanje ishoda terapije. Za potpuno razumijevanje bioloških sustava stoga se, osim genomskih i transkriptomskih analiza, neizostavno provodi i proteomska analiza (Wilkins i sur., 1996) koja obuhvaća identifikaciju i kvantifikaciju proteina u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama, analizu promjene proteinske ekspresije u normalnim i bolesnim stanicama, karakterizaciju poslijetranslacijskih modifikacija i proučavanje protein-protein interakcija. Najveći izazov u području proteomike je analiza proteina koji imaju važne regulatorne funkcije, poput primjerice enzima, faktora rasta, transkripcijskih faktora itd., a koji se u stanici nalaze u vrlo malim količinama što dodatno otežava analizu budući da ne postoji tehnika za amplifikaciju proteina (Kraljević Pavelić i Šaban, 2007).

Iako su metode razdvajanja proteina iz složenih smjesa (primjerice tkiva) već desetljećima relativno dobro poznate, tek je razvojem masene spektrometrije, računalnih

sustava i specifičnih računalnih programa za analizu proteina bilo moguće provesti globalne analize i identifikaciju proteina u živim sustavima. Zbog dinamičke prirode proteina te složenosti i varijabilnosti proteoma, proteomika mora biti selektivna i osjetljiva kako bi se istovremeno moglo analizirati tisuću i više različitih proteina u pojedinom istraživanom sustavu. Stoga proteomika ujedinjuje niz tehnika za separaciju proteina:jednodimenzionalnu i dvodimenzionalnu 2-DE gel elektroforezu na poliakrilamidnom gelu i tekućinsku kromatografiju (*engl.* liquid chromatography, LC), identifikaciju proteina uz pomoć spektrometrije masa kao i tehnike analize proteina uz pomoć bioinformatičkih metoda.

Osnovni metodološki pristupi tijekom proteomske analize koji su korišteni i u ovome radu uključuju (1) izolaciju proteina iz biološkog materijala, (2) razdvajanje proteina iz proteinske smjese, (3) identifikaciju razdvojenih proteina uz pomoć različitih analitičkih metoda poput masene spektrometrije (MS) te (4) identifikaciju i karakterizaciju proteina uz paralelno pohranjivanje rezultata u baze podataka (Banks i sur., 2000; Aebersold i Mann, 2003).

U analizi makularne degeneracije međutim, proteomske metode analize napravljene su samo za određivanje sastava druza u zdravih naspram ljudi oboljelih od makularne degeneracije (Crabb i sur., 2002), za diferencijalnu analizu proteoma mrežnice majmuna oboljelih od makularne degeneracije naspram zdravih majmuna uz pomoć metoda 2-DE u kombinaciji s masenom spektrometrijom (Okamoto i sur., 2010) te za analizu statusa modifikacije karboksietilpirol oksidativnog proteina i autoimunog odgovora na ovaj protein uz pomoć metode ELISA (Gu i sur., 2010). Sve su navedene studije pokazale razliku u ekspresiji proteina u oboljelim tkivima što ukazuje na važnost proteomskih analiza za identifikaciju novih biljega makularne degeneracije. Proteomske analize izuzetno su korisne za identifikaciju novih biljega bolesti i novih terapijskih meta kao i za rasvjetljavanje mehanizama djelovanja lijekova, njihove toksičnosti ili rezistentnosti u sklopu pred-kliničkih i kliničkih testiranja (Kraljević Pavelić i sur., 2009; Sedić, 2006; Sedić i sur., 2011). U ovoj su doktorskoj disertaciji stoga ove metode korištene za globalno profiliranje proteoma mrežnice oboljelih štakora.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Makularna degeneracija oka je sve učestalija bolest starije populacije ljudi čija incidencija pojavljivanja premašuje 10% ukupne populacije te kao najvažniju posljedicu svoga djelovanja uzrokuje parcijalni ili totalni gubitak vida i time uvelike otežava živote ljudi. S obzirom kako ne postoji adekvatna terapija za liječenje ove bolesti, glavni cilj predložene doktorske disertacije bila je detaljna analiza molekularnih mehanizama nastanka i razvoja makularne degeneracije na razini proteoma na modelu štakora u svrhu iznalaženja novih biljega bolesti.

Pojedinačni ciljevi istraživanja su stoga:

1. Uspostava animalnog modela za praćenje razvoja degeneracije mrežnice oka u štakora
2. Utvrđivanje obrazaca ekspresije proteina mrežnice ozračenih životinja prije i nakon zračenja oka uz pomoć metoda proteomike
3. Utvrđivanje novih mehanizama patogeneze makularne degeneracije
4. Iznalaženje novih dijagnostičkih i terapijskih biljega za makularnu degeneraciju

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Model makularne degeneracije retine *in vivo*

Za proučavanje makularne degeneracije oka i praćenje bioloških procesa odnosno patogeneze bolesti korišten je animalni model za ovu bolest. Iako već postoje različiti animalni modeli za izučavanje degeneracije retine, najčešće miševi, u ovoj disertaciji po prvi puta je predložen model praćenja makularne degeneracije oka na modelu štakora. Glavni razlog zbog čega su korišteni štakori je veća količina raspoloživog biološkog materijala koji je neophodan za proteomske analize.

3.1.1. Pokusne životinje

Za pokus je korišteno 16 mužjaka i 16 ženki štakora Male Wistar Albino sa Instituta za medicinska istraživanja, starosti četiri mjeseca. Životinje su *ad libitum* hranjene komercijalnom hranom za glodavce (Mucedola, Italija) te pitkom vodom *ad libitum*. Držane su u adekvatnim kavezima te pod sobnim svjetlom do trenutka zračenja retine. Pokus je odobren od strane Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković. Tijekom trajanja pokusa u razdoblju od mjesec dana, dva štakora su uginula te je ukupno iskorišteno 30 štakora.

3.1.2. Metoda zračenja oka

Štakori su prije zračenja oka (retine) anestetizirani intraperitonealnom injekcijom nembutala 0,1 ml/100 g, te 0,1 ml/100g ketoprofena (Pliva, Hrvatska). Potom su životinje polegnute otvorenih očiju na podlogu ispred koje se nalazila UV lampa 3UV-38 (Cole-Palmer International, SAD) prema uputama proizvođača na propisanoj udaljenosti od 15 cm. U ravnini glava položenih štakora postavljen je detektor zračenja za odgovarajuće UV-područje, kako bi se točno izmjerila ozračena doza očiju. Vrijeme ozračivanja iznosilo je 10 minuta.

Životinje su podijeljene u 3 skupine:

- skupina A: šest mužjaka i šest ženki štakora ozračeno je uz pomoć zraka UVA valne duljine $\lambda = 365$ nm. Doza zračenja iznosila je 500 mJ/cm^2 ,
- skupina B: šest mužjaka i šest ženki štakora ozračeno je uz pomoć zraka UVB valne duljine $\lambda = 302$ nm. Doza zračenja iznosila je 35 mJ/cm^2 ,
- kontrolna skupina (K): tri mužjaka i tri ženke štakora nisu ozračeni odnosno, služili su kao kontrolne životinje.

3.1.3. Slikanje fundusa oka i eksplantacija mrežnica

Nakon zračenja, fundus oka štakora snimljen je tzv. fundus-kamerom (Kowa, Japan). Slikanjem su kod ozračenih štakora utvrđene patološke promjene koje uključuju klasične simptome degeneracije retine: neovaskularizaciju, depigmentaciju i nakupljanje druza. Kod kontrolnih životinja nisu utvrđene promjene u strukturi retine. Štakori su potom eutanazirani, mrežnice su eksplantirane i pohranjene odmah u krioepruvete i tekući dušik na -185°C do daljnje analize.

3.2. Izolacija proteina iz tkiva mrežnica

Mrežnice štakora usitnjene su i homogenizirane tekućim dušikom u tarioniku. Homogenizirano tkivo je potom otopljeno u 1 ml pufera za lizu (7M urea/2M tiourea (Sigma-Aldrich-Aldrich), 4% (w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich-Aldrich), 0,2 % (w/v) smjesa amfolita pH 3-10 (BIO-RAD, SAD), 1% (w/v) ditiotritol (DTT) (Sigma-Aldrich-Aldrich, SAD) i 1x koktel inhibitora proteaza (Roche, Švicarska) te je prikupljeni lizat podvrgnut sonikaciji 4 mm sondom, snage 6 W, četiri puta po 10 sekundi (MicrosonTM, PGC Scientifics, SAD). Nakon soniciranja uzorcima je dodano po 10 μl smjese nukleaza (Amersham, SAD), nakon čega su uzorci inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi uz protresanje na termomješalici (Eppendorf, Njemačka). Potom su uzorci centrifugirani 45 minuta na 13 200 rpm i 20°C (Eppendorf, Njemačka) a supernatant je pohranjen na -20°C .

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina u lizatu

Iz lizata tkiva odvojeno je 3x15 µl uzorka u čiste plastične epruvete (Eppendorf, Njemačka), te dodano četiri volumena čistog acetona (Kemika, Hrvatska) ohlađenog na -20°C. Smjesa je ostavljena na -20°C preko noći kako bi se uklonile ionske nečistoće i lipidi, a proteini ukoncentrirali taloženjem. Nakon što su se proteini istaložili, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4°C i 13 200 rpm (Eppendorf, Njemačka). Aceton je uklonjen, talog je osušen u koncentratoru, te mu je dodano 15 µl pufera za kvantifikaciju proteina (0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol [sve kemikalije su od Sigma-Aldrich-Aldrich, SAD]), nakon čega je inkubiran na 30°C dok se nije u potpunosti otopio.

Koncentracija proteina u lizatu određivala se pomoću komercijalnog kompleta za kvantifikaciju proteina (DC Protein Assay Kit, BIO-RAD, SAD), baziranog na reakciji proteina sa lužnatom otopinom bakrovog tartarata (reagens A'), koji potom reducira Folinov reagens (reagens B) (Lowry, O. i sur., 1951). Na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica u triplikatu je nanoseno po 5 µL standarda albumina goveđeg seruma u pet različitih koncentracija (0.2, 0.6, 0.8, 1.2 i 1.5 mg cm⁻³). U ostale jažice nanoseno je također po 5 µl uzoraka, koji su napravljeni u različitim razrjeđenjima tako da je dodan određeni volumen (5, 25 i 50 µl) pufera za kvantifikaciju proteina. Potom je u svaku jažicu dodano po 25 µl reagensa A', koji je dobiven miješanjem reagensa S i reagensa A. Nakon toga u svaku jažicu dodano je po 200 µl reagensa B. Pločice su zatim inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je pomoću spektrofotometra (Thermolab Systems, SAD) očitana apsorbancija na 750 nm. Na osnovu očitanih vrijednosti apsorbancija standarda konstruirana je baždarna krivulja ovisnosti apsorbancija o koncentraciji iz koje je potom ekstrapolacijom na X-osi izračunata koncentracija proteina u uzorku.

Tablica 1. Koncentracije proteina izražene u mg/ml lizata za uzorke koji su korišteni za analizu 2-DE.

UZORAK	KONCENTRACIJA mg/ml	UZORAK	KONCENTRACIJA mg/ml
1A	6.561	16A	3.087
1B	6.326	16B	4.252
2A	1.841	17A	4.513
2B	0.771	17B	2.860
3A	1.823	18A	10.542
3B	3.289	18B	10.313
4A	3.980	19A	3.572
4B	6.162	19B	3.219
5A	7.534	20A	2.613
5B	8.931	20B	4.702
6A	2.501	21A	1.383
6B	5.880	21B	1.426
7A	1.933	22A	6.185
7B	1.860	22B	2.466
8A	0.921	23A	4.825
8B	0.814	23B	7.636
9A	1.383	24A	3.943
9B	1.626	24B	3.265
10A	1.420	25A	3.053
10B	1.626	25B	3.263
11A	2.556	26A	2.174
11B	1.731	26B	6.877
12A	5.613	27A	5.868
12B	7.861	27B	6.831
13A	5.692	28A	4.691
13B	4.122	28B	6.432
14A	2.226	29A	6.185
14B	4.229	29B	5.733
15A	1.915	30A	6.187
15B	6.044	30B	4.226

3.3. DVODIMENZIONALNA GEL – ELEKTROFOREZA (2-DE)

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) je metoda koja se koristi za analizu složenih proteinskih smjesa iz stanica, tkiva, tjelesnih tekućina ili drugih bioloških uzoraka. 2-DE objedinjuje dvije elektroforetske metode: izoelektrično fokusiranje (IEF) i SDS-poliakrilamidnu gel-elektroforezu.

3.3.1. Izoelektrično fokusiranje – IEF

Izoelektrično fokusiranje (IEF) se provodi u tzv. imobiliziranom gradijentu pH (*engl.* immobilized pH gradient, IPG) koji se komercijalno dobiva kovalentnom ugradnjom gradijenta kiselih i bazičnih puferirajućih grupa u poliakrilamidni gel u trenutku njegove polimerizacije. Tako pripremljeni gel se izljeva na plastičnu podlogu, te se nakon ispiranja katalizatora polimerizacije i nepolimeriziranih monomera suši i reže na 3 mm široke trakice – tzv. trakice IPG (*engl.* IPG strips), koje se onda koriste za izoelektrično fokusiranje. U gradijentu pH, protein će se pod utjecajem električnog polja početi kretati prema elektrodi sa suprotnim nabojem, te će tijekom migracije ili primati ili otpuštati protone. Posljedica toga je promjena ukupnog naboja proteina i smanjenje njegove pokretljivosti. Točka u gradijentu pH gdje se protein zaustavlja je ona točka gdje je njegov ukupni naboj jednak nuli (izoelektrična točka, pI). Taj tzv. fokusirajući učinak koji koncentrira proteine na njihovim izoelektričnim točkama omogućava razdvajanje proteina s obzirom na vrlo male razlike u naboju.

Proteinski lizati za izoelektrično fokusiranje pripremljeni su taloženjem u acetonu, na isti način kao i za kvantifikaciju. Nakon uklanjanja acetona i sušenja taloga, talog je otopljen u radnom puferu, (7M urea, 2 M thiourea (Sigma-Aldrich-Aldrich), 4%(w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich-Aldrich); 400 µl pufera na 1000 µg proteina) kojem je dodan w/ v) 1% DTT-a (Sigm-Aldrich) te inhibitori proteaza na 1 ml radnog pufera (Roche, Švicarska), inkubacijom u termo-miješalici (Eppendorf, Njemačka) na 30°C. U otopljeni uzorak dodano je bromfenol modrilo, te je uzorak uz pomoć pipete nanesen uzduž kanala uređaja

za fokusiranje (*engl.* focusing tray). Zatim je na uzorak pažljivo položena trakica IPG (17 cm, pH 3-10NL, BIO-RAD, SAD) s gradijentnim gelom okrenutim prema dolje, te su svi nastali mjehurići zraka uklonjeni laganim podizanjem i spuštanjem trakica u kanale. Kako bi se spriječilo isušivanje i kontaminacija, na IPG trakice dodano je 4-5 ml mineralnog ulja, te su trakice podvrgnute aktivnoj rehidraciji (PROTEAN IEF cell, BIO-RAD, SAD) pri 50 V na 20°C 14 sati.

Nakon rehidracije ispod svake trakice su na obje elektrode položeni navlaženi filter-papirići, te je dalje provođeno izoelektrično fokusiranje prema uvjetima navedenim u tablici 1.

Tablica 2. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja za analitičke gelove 2-DE pH 3-10 NL (ukupno je korišteno 1000 µg istaloženih proteina).

KORAK	PORAST NAPONA	OSTVARENI NAPON/V	TRAJANJE/h	TRAJANJE/VOLT SAT (V·h)
S1	BRZI	250	0:15	/
S2	SPORI	5000	2:00	/
S3	BRZI	10000	-	65000
S4	SPORI	500	24:00	/

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja trakice su ocijeđene od mineralnog ulja, i pohranjene na -20°C do daljnje analize.

3.3.1.1. Ekvilibracija trakica IPG

IPG-trakice su ekvilibrirane s ekvilibracijskim puferom (50 mM Tris-HCl pH 8.8 (Sigma-Aldrich, SAD), 6M urea (Sigma-Aldrich, SAD), 30% w/v glicerol (Sigma-Aldrich, SAD), 2% w/v SDS (Sigma-Aldrich, SAD), bromfenol modriilo kojem je dodano 1% w/v ditiotreitola (Sigma-Aldrich, SAD), te su lagano protresane 15 minuta na vodoravnoj mješalici. Postupak je ponovljen s ekvilibracijskim puferom kojem je dodano 25 g dm⁻³ jodoacetamida (IAA), (Sigma-Aldrich, SAD). DTT reducira disulfidne

mostove, a IAA alkiliranje sulfhidrilne grupe na proteinima i sprječava njihove re-oksidacije tijekom elektroforeze, te tako sprječava neželjene interakcije između cisteinskih ostataka, što je izuzetno važno za daljnju identifikaciju proteina uz pomoć spektrometrije masa.

3.3.2. SDS-Poliakrilamidna gel - elektroforeza - (SDS-PAGE)

Nakon izoelektričnog fokusiranja, u drugoj dimenziji proteini se razdvajaju prema relativnoj molekularnoj masi (M_r) uz pomoć elektroforeze na uspravnom poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev laurilsulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Pore SDS-poliakrilamidnog gela djeluju kao molekularno sito koje razdvaja proteine prema veličini, a ne naboju. Naime SDS se veže na proteine (otprilike 1.4 g SDS/ g proteina) i stvara s njima anionske komplekse. Postoji niz čimbenika (veličina gela, gradijent pH i upotrijebljena metoda bojanja gela) koji utječu na moć razdvajanja tijekom 2-DE. Smatra se kako je uz pomoć dvodimenzionalne elektroforeze moguće razdvojiti 2000 - 5000 proteina istovremeno a detektirati i kvantificirati se može < 1 ng proteina po proteinskoj točki. Za svrhe ove disertacije pripremljena je smjesa za 12 %-tni gel, debljine 1 mm i dimenzija 20 x 18 cm od 33.5 mL destilirane vode, 25 mL 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 1 mL 10% (w/v) SDS, 40 mL otopine akrilamid/bisakrilamid (30.8% T; 2.7% C_{bis}) (Sigma-Aldrich, SAD), 500 μ L 10% (w/v) amonij-persulfata (APS) (Sigma-Aldrich, SAD) i 50 μ L TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich, SAD). Smjesa je pažljivo izlivena u prethodno složena stakla za gelove i potom prekrivena n-butanolom (Kemika, Hrvatska) da bi se spriječila oksidacija na površini gela. Nakon što su gelovi polimerizirali, n-butanol je uklonjen s površine gelova višekratnim ispiranjem s destiliranom vodom. Staklene ploče s gelovima su zatim pričvršćene na jedinicu za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu (PROTEAN II XL cell, BIO-RAD, SAD) i umetnute u komoru za elektroforezu. S površine gelova uklonjena je preostala voda, te su između stakala umetnute trakice IPG koje su prethodno ekvilibrirane i kratko isprane u puferu za elektroforezu (25 mmol dm⁻³ Tris, 192 mmol dm⁻³ glicin, 10 g dm⁻³ SDS, pH=8,3). Prilikom umetanja trakica laganim pritiskom uklonjeni su svi zaostali mjehurići zraka. Trakice su zatim prekrivene s otopinom agaroze

koja je pripremljena otapanjem 0,5 g agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) i 200 μl $2 \cdot 10^{-6}$ g dm^{-3} bromfenol modrila u 100 ml pufera za elektroforezu. U komoru je stavljen pufer za elektroforezu (25 mM tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3), jedinica za hlađenje se spojena je na vodu, sustav je poklopljen te je pokrenuta elektroforeza pri uvjetima 15 mA/gelu 30 min., a potom 20 mA/gelu dok bromfenol modrilo ne doputuje do ruba gela (otprilike 5 sati). Nakon završene elektroforeze gelovi su obojani bojom Coomassie Brilliant Blue.

3.3.2.1. Bojanje gelova

Za bojanje gelova 2-DE korištena je modificirana metoda po Neuhoff-u tako da se pripremila matična (*engl.* stock) otopina koloidne Coomassie boje sljedećeg sastava: 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD, SAD), 2% (v/v) H_3PO_4 (Kemika, Hrvatska) i 10% (w/v) amonijevog sulfata (Kemika, Hrvatska), koja je stabilna nekoliko tjedana na sobnoj temperaturi. Neposredno nakon završetka elektroforeze pripremi se radna otopina za bojanje miješanjem matične otopine i metanola (Kemika, Hrvatska) u omjeru 4:1, u kojoj se gelovi inkubiraju preko noći na sobnoj temperaturi uz lagano potresanje, pri čemu se gelovi istovremeno i fiksiraju i oboje. Nakon toga gelovi se sustavno ispiru u redestiliranoj vodi sve dok se ne izgubi intenzivno plavo obojenje pozadine gela. Tako obojani gelovi se čuvaju u redestiliranoj vodi na + 4°C.

3.3.2.2. Računalna analiza gelova i rezanje spotova

Nakon bojanja gelovi su snimljeni i denzitometrijski analizirani uređajem za analizu gelova (VersaDoc Imaging System, model 4000, BIO-RAD, SAD). Vrijeme ekspozicije iznosilo je 10 sekundi. Gelovi su potom dodatno kvantitativno analizirani pomoću specijaliziranog računalnog programa za analizu 2-DE gelova (PDQuest SW, verzija 7.4.0, BIO-RAD, SAD). Gelovi su normalizirani neposredno prije analize metodom ukupne gustoće na slici gela (*engl.* total density in gel image), kod koje se zbrajaju vrijednosti optičkih gustoća svih točaka unutar slike. Usporedbom zbrojenih vrijednosti

dobivena je osnova za normalizaciju. Uz kvalitativnu razliku između analiziranih skupina napravljena je i kvantitativna analiza pri kojoj je pet puta povećana ili smanjena ekspresija proteina u uzorku smatrana kao značajna vrijednost. Analizom u programu PDQuest odabrane su proteinske točke na gelovima koje su ručno izrezane uz pomoću nastavka pipetora, tako što je vrh nastavka ovisno o veličini točke na gelu odrezan škarama. Izrezani komadići gela stavljeni su u čiste 1,5 ml plastične epruvete (Eppendorf, Njemačka) s 1 ml otopine za uklanjanje boje (40% metanola, 10% octene kiseline, sve Kemika, Hrvatska) te su ostavljeni na termo-miješalici (Eppendorf, Njemačka) preko noći a minimalno 12 sati na sobnoj temperaturi da bi se uklonila vezana boja.

3.4. SPEKTROMETRIJA MASA

Uz pomoć metode spektrometrije masa moguće je razdvojiti ionizirane atome ili molekule prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z). Stoga se ova metoda koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula i za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama. Osnovni dijelovi spektrometra masa su: ionizator, analizator masa i ionski detektor. U spektrometru masa analizirani uzorak se uvodi u izvor iona u tekućem ili plinskom stanju gdje se fragmentira i ionizira. Nastali ioni potom prvo putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema njihovim omjerima m/z , a potom odlaze u detektor koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što rezultira stvaranjem spektra masa. Postoji nekoliko različitih metoda ionizacije, među kojima se ionizacija elektro-raspršenjem (*engl.* electrospray ionization, ESI) i matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (*engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) najčešće koriste u analizi proteina i peptida.

ESI stvara ione direktno iz otopine, te je stoga povezan s uređajima za tekućinsku kromatografiju ili kapilarnu elektroforezu. Uzorak se raspršuje u aerosol kojeg tvore nabijene kapljice u prisutnosti snažnog električnog polja, nakon čega se kapljice počinju smanjivati zbog isparavanja otapala pri čemu se višestruko nabijeni ioni otpuštaju s kapljica i odlaze u analizator. Kod MALDI-tehnike, uzorak se pomiješa sa spojem koji absorbira UV-zračenje, tzv. matricom (*engl.* matrix), poput npr. α -cijano-4-hidroksi-trans-cimetne kiseline i sinapinske kiseline, 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, što rezultira indirektnim isparavanjem uzorka. Ioni uzorka (protonirane molekule) se stvaraju uslijed razmjene elektrona i protona između uzorka i pobuđene matrice.

Analizatori masa su ključna točka u MS - analizi. Četiri najčešće korištena analizatora u proteomskim istraživanjima su: četveropol (*engl.* quadrupole), analizator vremena leta (*engl.* time-of-flight, TOF), ionska stupica (*engl.* ion trap) i Fourier transformirana ionska ciklotronska rezonancija (*engl.* Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR). MALDI je obično povezan s TOF analizatorima koji mjere masu intaktnih peptida, a ESI s analizatorima ionskih stupica i trostrukim četveropolnim analizatorima. Nadalje, disocijacijom izazvanom sudarima (*engl.* collision-induced dissociation, CID) s molekulama inertnog plina moguće je dobiti spektre ionskih fragmenata nastalih iz izabranih iona-preteča. Ukoliko je potrebna veća rezolucija (moć razdvajanja) iona nastalih iz molekule nepoznatog uzorka s ciljem strukturne identifikacije uzorka, koristi se tandemski spektrometar masa (MS/MS) koji ima dva ili tri analizatora odvojena tzv. stanicom za sudare (*engl.* collision cell).

Najjednostavnija metoda za strukturnu analizu proteina u proteomskim istraživanjima je identifikacija proteina na temelju određivanja masa njihovih peptidnih fragmenata (*engl.* peptide mass fingerprinting, PMF). Nepoznati protein se izreže iz 2-DE gela i pocijepa s tripsinom, proteazom koja specifično cijepa proteine na karboksilnom kraju argininskih i lizinskih ostataka.

Tako pocijepani proteini različitog amino-kiselinskog slijeda stvaraju seriju masa peptida koja se može detektirati pomoću MALDI-TOF spektrometra masa. Spektar dobivenih masa peptida jedinstven je za svaki pojedini protein poput otiska prsta (tzv. mass fingerprint). Usporedbom izmjerenih masa peptidnih fragmenata nepoznatog proteina sa *in silico* generiranim, pretpostavljenim masama peptida dobivenih teoretskom digestijom proteina s tripsinom u dostupnim proteinskim bazama podataka (npr. Swiss-Prot, <http://www.expasy.org/sprot>) moguće je identificirati nepoznati protein. Ukoliko se protein ne uspije identificirati na opisani način (npr. mali kiseli proteini koji ne daju

dovoljno peptida nakon digestije tripsinom), tada se jedan ili više peptida fragmentiraju te im se određuje slijed kratkog amino-kiselinskog odsječka pomoću MS/MS (najčešće spektrometra masa s kvadrupolom i analizatorom vremena leta, Q-TOF MS).

3.4.1. Priprema uzoraka za analizu na MALDI – TOF/TOF spektrometru masa

Nakon odbojavanja komadići gela se prebace u 500 µL 50mM amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) (Kemika, Hrvatska) da se gel omekša. Komadići gela se inkubiraju 2 puta po 5 min. na termo-miješalici (500 rpm, Eppendorf, Njemačka), nakon čega se svaki put otopina amonij-hidrogenkarbonata ukloni. Slijedi ispiranje opet u 500 µL amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8), pola sata na termo-miješalici (Eppendorf, Njemačka) pri 500 rpm. Ostatak otopine se ukloni, a u svaku epruvetu s komadićem gela doda se po 500 µL otopine 50% 50mM amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) i 50% aceto-nitrila (MeCN) (J.T. Baker, Nizozemska) te se stavi na termomikser 30 min. na 500 rpm uz povremeno miješanje preko noći. 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 min. na termomikser (Eppendorf, Njemačka) pri 500 rpm. Ostatak se baci, a uzorak se suši u uređaju za sušenje (Speed Vac, Eppendorf, Njemačka). Zatim se u svaki uzorak dodaje približno 20 µL tripsina (Merck, SAD) tako da se prethodno pripremi 20 µg/mL otopina tripsina (Merck, SAD) u amonij-hidrogenkarbonatu, a sve se to radi u malim kivetama od 200 µL. Takvi uzorci se inkubiraju 18 sati na 37°C. Nakon toga se iz uzorka uzme tripsinski pufer i na vakuum pumpi se liofilizira, a u preostale komadiće gela se u svaku epruvetu doda po 50 µL 5%-tne otopine trifluoroctene kiseline (TFA) (Merck, SAD) i 50% aceto-nitrila (MeCN) (J.T. Baker, Nizozemska), inkubira se 15 min. u ultrazvučnoj kupelji te 15 min. na termomikseru. Postupak se ponovi dva puta. Zatim se ekstrakti spoje i liofiliziraju u vakuum pumpi na 20°C. Uzorci se zatim otope u 10 µL 0.1%-tne TFA i pročiste kroz posebne tipseve (Zip Tip, Eppendorf, Njemačka). Zip Tip služi da se od peptida odvoje soli, komadići gela, ostaci boje, APS, TFA, MeCN i ostale soli. Najprije se kolone pripreme tako da se po tri puta u nastavak s kolonom unese i ispusti 10 µL 80% MeCN (J.T. Baker, Nizozemska), 20% H₂O s 0.1% TFA (Merck, SAD). Zatim slijedi ispiranje

tri puta po 10 μL 50% MeCN, 50% H₂O s 0.1% TFA. Zadnji korak pripreme kolone uključuje ispiranje tri puta 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 pripremljenu 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 sa u kolonu uvuče 10 μL 80% MeCN, 20% H₂O s 0.1% TFA i otpipetira u novu epruvetu (Eppendorf, Njemačka). Postupak se ponovi 10 puta. Uzorak se osuši u vakuum pumpi, nakon čega se nalazi u liofiliziranoj fomi. Zatim se uzorak pomiješa s matricom (CHCA) (Waters, SAD) i nanosi na pločicu. Ukupno se dodaje 5 μL matrice, a na pločicu se nanosi 1 μL .

3.4.2. Analiza spektrometrom masa MALDI TOF/TOF

Uzorci su analizirani uz pomoć spektrometra masa MALDI TOF/TOF (4800 plus MALDI TOF/TOFTM, Applied Biosystems, SAD). Prvo su podešeni standardni kalibracijski parametri na uređaju, te su potom snimljeni spektri svih uzoraka nanesenih na MALDI pločicu. Zatim je provedena interna kalibracija uz pomoć signala peptida nastalih autolizom tripsina (tablica 3.).

Tablica 3. Signali peptida nastalih autolizom tripsina

Teoretski izračunata monoizotopna masa (m/z)	Naboj $[M + H]^+$	Molekulska formula
515,3305	1	C ₂₂ H ₄₂ N ₈ O ₆
842,5100	1	C ₃₇ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₁
1045,5642	1	C ₄₃ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₆
2211,1046	1	C ₉₆ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₃₃
2283,1807	1	C ₁₀₁ H ₁₆₃ N ₂₇ O ₃₁ S
3161,4957	1	C ₁₃₅ H ₂₁₇ N ₃₅ O ₄₆ S ₃

3.5. Identifikacija proteina uz pomoć baza podataka

Na osnovi dobivenih MS i MS/MS spektara, baze podataka pretraživane su uz pomoć specijaliziranog računalnog programa Mascot verzija 2.1 (Matrix Science). Pretražene su baze SwissProt, MSDB i NCBIInr. Uvjeti pretraživanja bili su $p < 0,05$, te se pozitivnim nalazom smatrala vrijednost veća od 58, čija je granica određena kao signifikantna vrijednost vjerojatnosti prema Mowse rezultatu (*engl.* Probability Based Mowse Score).

3.6. Tekućinska kromatografija – analiza LC-MS/MS

Tekućinska kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za separaciju otopljenih tvari. Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom radi razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličini tvari koje se razdvajaju, te imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Odabirom prikladne metode kompatibilne sa spektrometrijom masa (hlapljivi puferi, stabilan i niski protok, upotreba polarnih organskih otapala), tekućinski kromatograf može biti spregnut sa spektrometrom masa. Izvor iona, analizator (ili kombinacija više analizatora u istom instrumentu, tzv. tandemski spektrometrija masa) i detektor iona su odabrani u ovisnosti o vrstama analiza, koje mogu biti jednostavne analize određenog iona ili kvalitativno substrukturne i kvantitativne analize kompleksnih smjesa. Tehnika LC-MS/MS predstavlja dodatnu mogućnost analize iona, s ciljem da se poboljša separacija ili izazove dodatna fragmentacija molekule kako bi se na temelju dobivenih spektara masa odredila struktura analiziranog iona. Razvoj tehnika na područjima mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizacije pri atmosferskom tlaku i povezivanja ionizatora i analizatora, omogućio je rutinsku upotrebu vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, LC-MS.

3.6.1. Priprema uzoraka za analizu na spektrometru masa LTQ-FT (*engl.* Linear Trap Quadrupole-Fourier Transform)

Za analizu uz pomoć tekućinske kromatografije (LC-MS/MS) 6 uzoraka iz svake skupine pripremljeno je za analizu na spektrometru masa LTQ-FT (Synapt G2, Waters, SAD) uz

pomoć komercijalnog kompleta za digestiju proteina RapiGest^{SF} (Waters, SAD), a prema uputama proizvođača. Ukratko, istaloženo je po 250 µg proteina te dodano četiri volumena čistog acetona ohlađenog na -20°C. Smjesa je ostavljena na -20°C preko noći kako bi se uklonile ionske nečistoće i lipidi, a proteini ukoncentrirali taloženjem. Zatim je pripremljena radna otopina za digestiju proteina uz pomoć RapiGest^{SF}. Liofilizat RapiGest^{SF} je otopljen u 500 µl 50 mM amonijevog hidrogen bikarbonata (NH₄HCO₃, Sigma-Aldrich) te je tako napravljena 0.1 %-tna radna otopina. Nakon što su se proteini istaložili, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4°C i 13 200 rpm. Aceton je uklonjen, talog je osušen u koncentratoru, a na njega je dodano 50 µl radne otopine RapiGest^{SF}. Potom je u svaki uzorak dodano po 0.3 µl 5mM DTT (Sigma-Aldrich) te je nakon inkubacije od 30 minuta na 50 °C dodano još po 0.75 µl 15mM iodoacetamida (Sigma-Aldrich). Uzorci su potom inkubirani u zamračenoj komori kroz 30 minuta. Svim uzorcima je zatim dodano po 7.5 µl tripsina i inkubirano 4 sata na 37 °C. Neposredno prije analize u sve je uzorke dodanae kloridna kiselina (HCl) u konačnoj koncentraciji od 250 mM na 37 °C kroz 45 minuta. Uzorci su potom centrifugirani 10 minuta na 4°C i 14000 rpm. Supernatant je sakupljen i podvrgnut reverzno-faznoj nano-tekućinskoj kromatografiji na kolonama C18 (Waters, SAD). Separacija LC (tekućinska kromatografija) je provedena na sistemu Eksigent nanoLC-Ultra[®] 2D plus sistemu u kombinaciji sa sistemom cHiPLC[®]-nanoflex system. Pri tome je korišten metodološki pristup vezanja i eluiranja (tzv. Trap & Elute Scheme). Za analizu ESI-MS/MS eluat dobiven nanofrakcioniranjem uz pomoć LC se ubrizgao u spektrometar masa LTQ-FT (Synapt G2, Waters, SAD).

3.6.2. Identifikacija proteina uz pomoć baza podataka

Na osnovi dobivenih MS i MS/MS spektara, baze podataka pretraživane su uz pomoć specijaliziranog računalnog programa Mascot verzija 2.1. Ukupno je identificirano 1246 proteina. Od tog broja 18,4 % je bilo lažno pozitivnih na nivou proteina dok je taj postotak na nivou peptida iznosio 5,3 %. Pri identifikaciji proteina korišteni su sljedeći minimalni granični parametri: jedan peptid po proteinu je smatran

značajnim, sekvenca peptida od 95% te protein potvrđen i sekvencioniran s minimalno 50% potvrdivosti.

3.7. Bioinfomatička obrada podataka

Uz pomoć specijaliziranih računalnih programa Mascot 2.1. (Matrix Science), Progenesis (Nonlinear Dynamics Limited, Velika Britanija) i Scaffold 3 (Proteome Software, SAD) napravljena je detaljna analiza dobivenih rezultata. Pri tome je Mascot 2.1. korišten za identifikaciju samih proteina, program Progenesis za kvantifikaciju proteina dok je program Scaffold 3 korišten za brojanje samih spektara pojedinih proteina.

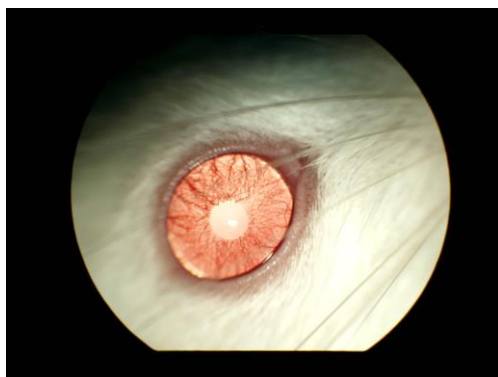
4. REZULTATI

Tema ove disertacije bila je proučiti patološke procese te patogenezu nastanka makularne degeneracije na nivou proteoma. Pri tome je uspostavljen animalni model na štakoru za praćenje razvoja degeneracije mrežnice oka. Štakori su podijeljeni u 3 jednake skupine od kojih su dvjema skupinama artifično oči ozračene sa UV A tj. UV B zrakama dok je treća predstavljala nezavisnu kontrolnu skupinu. Nakon zračenja svi su štakori uključujući i kontrolne, podvrgnuti slikanju fundusa oka kojim su ustanovljene patološke promjene kod zračenih skupina poput neovaskularizacije, depigmentacije i nakupljanja druza. Uzorci svih mrežnica su potom analizirani uz pomoć dvodimenzionalne gel elektroforeze (2-DE) te kompatibilnom tekućinskom kromatografijom, u kombinaciji s masenom spektrometrijom (MS). MS tehnologija omogućila nam je usporedbu i uvid u proteomske profile mrežnica štakora ozračenih sa UV zračenjima i kontrolnih štakora te omogućila identifikaciju, kako kvalitativno tako i kvantitativno promijenjenih proteina povezanih s nastankom patoloških promjena tj. makularne degeneracije.

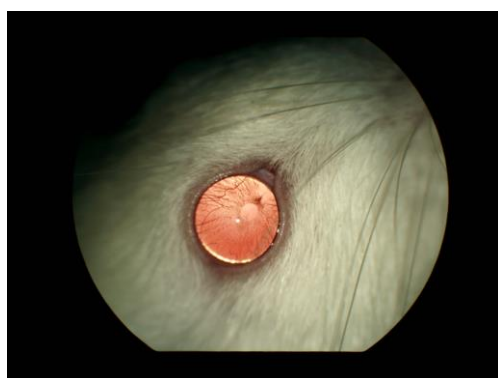
4.1. Uspostava modela štakora za istraživanje makularne degeneracije

Za proučavanje makularne degeneracije oka i praćenje bioloških procesa odnosno patogenezu bolesti uspješno je uspostavljen animalni model za ovu bolest. Iako već postoje različiti animalni modeli za izučavanje degeneracije retine, najčešće na modelu miša, u ovoj disertaciji po prvi puta je predložen model praćenja makularne degeneracije oka na štakorima. Glavni razlog zašto su korišteni štakori je veća količina raspoloživog biološkog materijala koji je neophodan za proteomske analize te dostatna baza identificiranih proteina štakora.

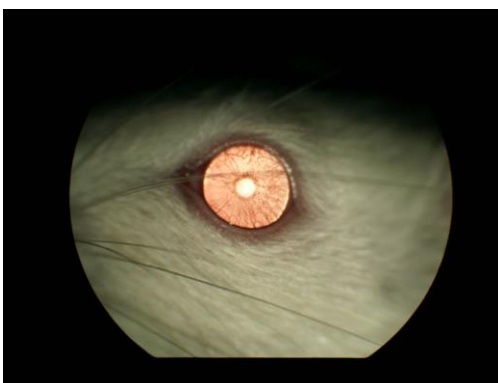
Po završetku pokusa štakorima su *in vivo* fotografirane oči kako bi se potvrdile degenerativne promjene vezane uz razvoj simptoma makularne degeneracije (Slika 9.). Na slikama je jasno vidljiv proces degeneracije mrežnice i pojava druza.



A



B

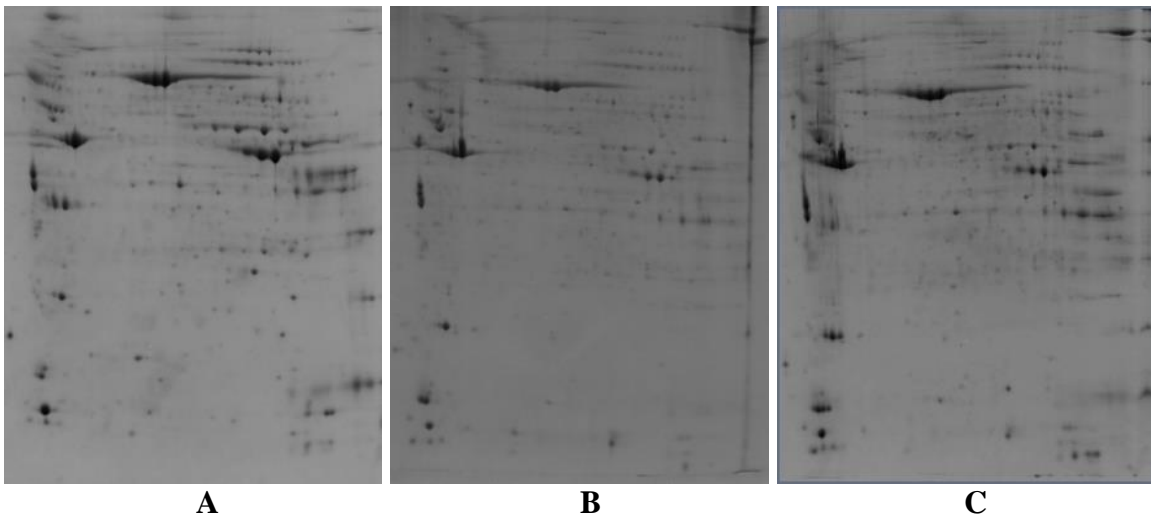


C

Slika 9. Prikaz degenerativnih promijena na mrežnici oka štakora nakon izlaganja oka zračenju s UVA i UVB zrakama (**A** - kontrola, neozračeno oko; **B** – oko ozračeno zrakama UVA; **C** – oko ozračeno zrakama UVB). Za slikanje je korištena funduskamera (Kowa, Japan).

4.2. Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE)

Za potrebe ovog istraživanja, ukupno je analizirano 15 poliakrilamidnih gelova dobivenih nakon 2-DE. Ukupni proteini iz skupine UVA i UVB razdvojeni su i analizirani na 6 gelova po grupi, dok su iz kontrolne skupine (K) analizirana ukupno 3 gela. Na svakom gelu bilo je moguće identificirati između 258 i 546 proteinskih točaka (slika 10). Cilj je bio identificirati one proteinske točke koje su diferencijalno eksprimirane između pojedinih grupa. Analiza je provedena uz pomoć računalnog programa PDQuest (BIO-RAD, SAD) kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, a sumarni rezultati analize su prikazani u tablicama 4 i 5.



Slika 10. Reprezentativne slike 2-DE gelova dobivenih razdvajanjem smjese ukupnih proteina iz mrežnice životinja kontrolne skupine (A), skupine UVA (B) i skupine UV B (C) u gradijentu pH 3-10. Dobiveni gelovi su obojani sa Coomassie Brilliant Blue G-250 bojom.

Kvalitativne i kvantitativne analize su ukazale na 132 diferencijalno eksprimirane proteinske točke, od čega je 11 proteinskih točaka bilo diferencijalno eksprimirano među grupama, a 121 proteinskih točaka je bilo 5 puta pojačano ili smanjeno eksprimiranih u pojedinoj skupini.

U skupini UVA je utvrđeno postojanje 5 jedinstvenih proteinskih točaka u odnosu na kontrolnu skupinu (K), te 2 jedinstvene proteinske točke u odnosu na skupinu UVB. U

kontrolnoj skupini (K) nije utvrđena niti jedna jedinstvena proteinska točka u odnosu na UV A i UV B skupinu. Nadalje, u skupini UVA utvrđeno je postojanje 27 proteinskih točaka čija je ekspresija bila 5 puta pojačana u odnosu na kontrolnu skupinu (K), 20 proteinskih točaka čija je ekspresija bila 5 puta smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu (K), 12 proteinskih točaka čija je ekspresija bila 5 puta povećana u odnosu na skupinu UVB, te 21 proteinska točka čija je ekspresija bila 5 puta smanjena u odnosu na skupinu UVB.

U skupini UVB utvrđeno je postojanje 3 jedinstvene proteinske točke u odnosu na kontrolnu skupinu (K), te jedna jedinstvena proteinska točka u odnosu na skupinu UVA. Također je utvrđeno postojanje 37 proteinskih točaka čija je ekspresija bila 5 puta pojačana u odnosu na kontrolnu skupinu (K), te 4 proteinske točke čija je ekspresija bila 5 puta smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu (K).

Tablica 4. Računalna analiza gelova uz pomoć računalnog programa PDQuest. Prikazan je ukupan broj utvrđenih pojedinačnih proteinskih točaka po uzorku

Uzorak mrežnice	Vrsta zračenja	Ukupni broj točaka	Broj združenih točaka	Postotak združenih proteinskih točaka ¹	Postotak združenih proteinskih točaka ²	Koeficijent korelacije
2A	UV A	515	260	50%	42%	0.493
3A	UV A	489	230	47%	37%	0.563
4B	UV A	412	192	46%	31%	0.541
6B	UV A	390	173	44%	28%	0.487
11A	UV A	519	215	41%	35%	0.435
12A	UV A	506	287	56%	47%	0.654
*16A	UV B	531	531	100%	87%	1
17A	UV B	510	306	60%	50%	0.722
19B	UV B	258	145	56%	23%	0.539
20A	UV B	393	223	56%	36%	0.616
23A	UV B	458	282	61%	46%	0.556
24B	UV B	525	277	52%	45%	0.623
27A	KONTROLA	501	265	52%	43%	0.648
28B	KONTROLA	546	270	49%	44%	0.569
30B	KONTROLA	429	251	58%	41%	0.69

¹Postotak združenih proteinskih točaka¹ - postotak združenih proteinskih točaka u odnosu na ukupni broj točaka u gelu.

²Postotak združenih proteinskih točaka² - postotak združenih proteinskih točaka u odnosu na tzv. virtualni združeni gel, engl. master-gel(označen sa zvjezdicom *).

Tablica 5. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize. Prikazan je ukupan broj diferencijalnih proteinskih točaka za svaku usporedbu. Kvantitativne razlike u ekspresiji prikazane su sa strelicom (↑ - pojačana ekspresija; ↓ smanjena ekspresija).

Vrsta analize/usporedba	Broj proteinskih točaka
KONTROLA u odnosu na UVA	0
KONTROLA u odnosu na UVB	0
UVA u odnosu na KONTROLU	5
UVB u odnosu na KONTROLU	3
UVA u odnosu na UVB	2
UVB u odnosu na UVA	1
5x↑ UVA u odnosu na KONTROLA	27
5X ↓ UVA u odnosu na KONTROLE	20
5x ↑ UVB u odnosu na KONTROLE	37
5x ↓ UVB u odnosu na KONTROLE	4
5X ↑ UVA u odnosu na UVB	12
5x ↓ u UVA u odnosu na UVB	21

4.3. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize gelova 2-DE

Nakon analize uz pomoć programa PDQuest, iz gelova su izrezane 132 proteinske točke za identifikaciju proteina uz pomoć masene spektrometrije (MALDI-TOF/TOF). Od 132 obrađene proteinske točke, uspješno je identificiran 61 protein prema bazi podataka NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Identificirani proteini su prikazani u tablicama 6-18. Pretraživanjem bioloških funkcija u NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) i UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) bazama podataka, ustanovljeno je da diferencijalno ekspimirani proteini identificirani nakon 2-DE analize sudjeluju u nizu različitih staničnih procesa uključujući metabolizam glukoze (glikoliza, glukoneogeneza), mitohondrijsku metaboličku aktivnost (citretni ciklus, oksidativna fosforilacija), apoptozu, proliferaciju, upalne procese, oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju, razgradnju neurotransmitera, prijenos signala u stanici (signalni put PI3K-Akt), kontrolu sinteze DNA i progresije staničnog ciklusa, strukturne komponente citoskeleta (aktinski

filamenti), razgradnju proteina, metabolizam nukleotida i aminokiselina, komunikaciju između stanica, regulaciju smatanja proteina i fagocitozu.

Zanimljivo je, međutim, istaknuti da rezultati 2-DE analize zaista potvrđuju promjene na strukturalnoj i molekularnoj razini koje su karakteristične za makularnu degeneraciju. Tako primjerice, povećana ekspresija proteina α A i α B kristalina u retini izloženoj UVA zračenju ukazuje da je ova vrsta zračenja kod štakora dovela do smanjenja retinalne funkcije, s obzirom da je prethodno dokazano da je α B kristalin, šaperon sa protu-apoptotskim i protu-upalnim funkcijama, molekularni biljeg za makularnu degeneraciju povezanu sa starenjem (Sreekumar i sur., 2010). Jedna od posljedica izlaganja štetnom zračenju svakako uključuje i oksidativni stres, a upravo se za ovaj proces smatra da ima važnu ulogu u patogenezi makularne degeneracije (Winkler i sur., 1999). U prilog ovoj tezi govore i promjene u ekspresiji nekoliko proteina koji imaju uloge u obrani stanice od oštećenja uzorkovana oksidativnim stresom poput primjerice mitohondrijske superoksid dismutaze 2, proteina koji štiti mišje stanice RPE od apoptoze inducirane oksidativnim stresom (Kasahara i sur., 2005), aldehid dehidrogenaze iz porodice 3 za koju je pokazano da štiti kornealne epitelne stanice čovjeka od oksidativnog oštećenja uzrokovanog UV-zračenjem (Pappa i sur., 2003), te prohibitin, tumor supresorski protein čija se promjena u ekspresiji smatra ranim signalnim događajem u RPE i retini uslijed oksidativnog stresa (Lee i sur., 2010). Gubitak vida u makularnoj degeneraciji povezanoj sa starenjem nastaje zbog oštećenja fotoreceptorskih stanica u makuli te popratnih strukturalnih anomalija u epitelu retinalnog pigmenta (RPE) i Bruch-ovoj membrani koje se smatraju glavnim karakteristikama ove bolesti. Studija koju su proveli Noell i suradnici pokazala je da kontinuirano izlaganje štakora jakim vidljivom svjetlu dovodi do selektivne degeneracije fotoreceptorskih stanica (Noell i sur., 1966). Slično tome, rezultati ovog istraživanja također ukazuju na indukciju apoptoze u retini štakora izloženim UVA i UVB zračenju, s obzirom na promjene u ekspresiji proteina koji pripadaju porodici aneksina (aneksin 1 i aneksin A8), a za koje je poznato da reguliraju programiranu smrt stanica (Rayborn i sur., 2006). Nadalje, dobiveni rezultati ukazuju na ulogu ekstracelularnog matriksa u nastanku degenerativnih promjena u makuli zračenih štakora slično kao i u makularnoj degeneraciji. Naime, glikokonjugati u interfotoreceptorskom matriksu imaju brojne važne uloge u interakcijama između fotoreceptora, stanica RPE i Müllerovih stanica, pri čemu

reguliraju međustaničnu adheziju i prijenos tvari između tih stanica (Uehara i sur., 2001). Tako je primjerice pokazano da je galektin 1 uključen u adheziju fotoreceptora i vanjskih slojeva retine tako što ulazi u interakciju s β -galaktozidnim ostacima na glikokonjugatima u interfotoreceptorskom matriksu i sinaptičkim pukotinama, dok je galektin 3 pojačano eksprimiran u Müllerovim stanicama retine štakora nakon kontinuiranog izlaganja svjetlosti pri čemu mu se pripisuje protu-apoptotska uloga (Uehara i sur., 2001). Slično tome, ova je studija otkrila specifičnu promjenu u ekspresiji galektina 5 u retini štakora, no fiziološka uloga ovog proteina u degenerativnim promjenama u oku za sada ostaje nerazjašnjena. Naposljetku, 2-DE analiza je otkrila promjenu ekspresije karbonske anhidraze 3, proteina koji je identificiran u leći oka zeca, čovjeka i goveda, no čija uloga u fiziologiji oka nije do danas objašnjena (Jampel i sur., 1997).

Tablica 6. Uspješno identificirani proteini jedinstveni za grupu UVA u odnosu na kontrole (K). Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa
1	Tpi1 protein	gi 38512111	539	26700.7
2	Kristalin	gi 809074	263	13578.8

Tablica 7. Uspješno identificirani proteini jedinstveni za grupu UVB u odnosu na kontrole (K). Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa/ kDa
1	Tpi1 protein	gi 38512111	323	26700.7
2	Fosfoferin fosfataza	gi 56789499	220	24951.8

Tablica 8. Uspješno identificirani proteini jedinstveni za grupu UVB odnosu na grupu UVA. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa	Status ekspresije
1	Gliceralehid 3-fosfat-dehidrogenaza	gi 56188	78	35813.3	5X↑ u UVA
2	Karbonska anhidraza 3	gi 31377484	201	29412.7	5X↑ u UVA
3	Kristalin, beta A1	gi 34872791	189	23267.8	5X↑ u UVA
4	Ran protein	gi 37590775	124	24407.6	5X↑ u UVA
5	Kristalin, beta A2	gi 27465611	290	22231.6	5X↑ u UVA
6	Kristalin	gi 809074	263	13578.8	5X↑ u UVA

Tablica 9. Uspješno identificirani proteini jedinstveni za grupu UVA u odnosu na UVB. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa
1	Keratin Kb4, tip II	gi 57012360	127	57631

Tablica 10. Uspješno identificirani proteini čija je ekspresija 5 X veća u grupi UVA u odnosu na grupu UVB. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa
1	Sličan kofilinu	gi 34865596	326	22064.7

Tablica 11. Uspješno identificirani proteini čija je ekspresija 5 X manja u grupi UVB u odnosu na kontrole (K). Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa	Status ekspresije
1	Albumin	gi 55391508	416	68714.1	5X ↓ u UVB
2	Superoksid dismutaza 2	gi 47477896	107	24667.6	5X ↓ u UVB
3	Nepoznati protein	gi 56691	240	116221.4	5X ↓ u UVB

Tablica 12. Uspješno identificirani proteini čija je ekspresija 5 X veća u grupi UVA u odnosu na kontrole (K). Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa	Status ekspresije
1	Nepoznati protein	gi 56691	240	116221.4	5X↑ u UVA
2	Aldehyd dehidrogenaza obitelj 3	gi 14010869	316	50306.7	5X↑ u UVA
3	Pkm2 protein	gi 38181543	356	52902.4	5X↑ u UVA
4	M2 piruvat kinaza	gi 206205	385	57744	5X↑ u UVA
5	Protein vezan uz pamćenje 2	gi 1930126	81	14494.4	5X↑ u UVA
6	Malat dehidrogenaza 1	gi 37590235	120	36461	5X↑ u UVA
7	Elektron-transfer-flavoprotein	gi 51948412	250	27670.1	5X↑ u UVA
8	Tpi1 protein	gi 38512111	539	26700.7	5X↑ u UVA
9	Adenilat kinaza 1	gi 13242235	392	21588.2	5X↑ u UVA
10	Sličan Cabc1 proteinu	gi 34881058	152	63139.8	5X↑ u UVA
11	Fosfoglicerat mutaza 2	gi 8393948	87	28736.8	5X↑ u UVA
12	Kristalin	gi 809074	263	13578.8	5X↑ u UVA

Tablica 13. Uspješno identificirani proteini čija je ekspresija 5 X veća u grupi UVB u odnosu na kontrole (K). Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa	Status ekspresije
1	Malat dehidrogenaza	gi 65937	163	63962	5X↑ u UVB
2	Lanac B, Klasa 3	gi 2392057	245	50219.6	5X↑ u UVB
3	Transketolaza	gi 12018252	161	71141.3	5X↑ u UVB
4	Fosfoglicerat kinaza 2	gi 54035400	62	44981.3	5X↑ u UVB
5	Alfa-metilacil-CoA racemaza	gi 6981184	188	39693.3	5X↑ u UVB
6	Albumin	gi 55391508	204	68714.1	5X↑ u UVB
7	Troponin T klasa Ia	gi 1256719	203	30729.9	5X↑ u UVB
8	Sličan Proteinu c20orf178 homologu	gi 34859079	95	13220	5X↑ u UVB
9	Nepoznati	gi 55249800	206	34970.4	5X↑ u UVB
10	Aneksin 1	gi 6978501	309	38804.9	5X↑ u UVB
11	Proteasom aktivator podjedinica 2	gi 8394091	142	26840	5X↑ u UVB
12	Aktin	gi 55577	139	42023.9	5X↑ u UVB
13	Sličan aktinu, alfa, srčani	gi 57108093	313	41991.9	5X↑ u UVB
14	Tpi1 protein	gi 38512111	138	26700.7	5X↑ u UVB
15	Elektron-transfer-flavoprotein	gi 51948412	117	27670.1	5X↑ u UVB
16	Sličan NADH dehidrogenazi	gi 27661165	275	23954.7	5X↑ u UVB
17	ATP sintaza, H⁺ transportirajući	gi 9506411	334	18769.6	5X↑ u UVB
18	Sličan Myl9 proteinu	gi 34860268	120	34547.4	5X↑ u UVB
19	Piruvat dehidrogenaza	gi 50925725	88	38957	5X↑ u UVB

20	Sličan mišićnoj glikogen fosforilazi	gi 34861509	297	97226.7	5X↑ u UVB
21	Sličan proteinu FLJ20699	gi 34867831	139	57021.8	5X↑ u UVB

Tablica 14. Uspješno identificirani proteini čija je ekspresija 5 X manja u grupi UVA u odnosu na kontrole (K). Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa / kDa	Status ekspresije
1	Antigen odbacivanja tumora gp96	gi 51858886	247	74161.6	5X ↓ u UVA
2	Prekursor mitohondrijske aldehid dehidrogenaze	gi 45737866	321	55566.2	5X ↓ u UVA
3	Sličan RIKEN cDNA	gi 34859187	260	55566.2	5X ↓ u UVA
4	Sličan sukcinil-CoA ligazi	gi 34874487	196	48219	5X ↓ u UVA
5	Alfa-1-makroglobulin protein	gi 21955142	147	167053.4	5X ↓ u UVA
6	Aneksin 1	gi 6978501	452	38804.9	5X ↓ u UVA
7	Prohibitin	gi 6679299	239	29801.9	5X ↓ u UVA
8	Sličan ugljikovoj anhidrazi I	gi 34855085	128	29597.8	5X ↓ u UVA
9	Podjedinica mitohondrijske H-ATP sintaze	gi 220904	348	18769.6	5X ↓ u UVA
10	Lektin, galaktoza vezujući, topivi 5	gi 6981154	252	16186	5X ↓ u UVA
11	Albumin	gi 55391508	217	68714.1	5X ↓ u UVA
12	Malat dehidrogenaza	gi 65937	65	63962	5X ↓ u UVA

Tablica 15. Kvantitativno diferencijalno eksprimirani proteini čija je ekspresija 5 X manja u UV A u odnosu na UV B uzorke. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim slijedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj prema bazi podataka NCBI	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa k/Da	Status ekspresije
1	ATP citrat liaza	gi 8392839	99	120558.7	5X ↓ u UVA
2	Propionil-CoA karboksilaza	gi 92654	184	77562.9	5X ↓ u UVA
3	Tip II keratin Kb4	gi 57012360	91	57631	5X ↓ u UVA
4	Gvanin deaminaza	gi 7533042	131	50868.7	5X ↓ u UVA
5	Albumin	gi 55391508	289	68714.1	5X ↓ u UVA
6	Izovaleril koenzim A dehidrogenaza	gi 6981112	107	46405.8	5X ↓ u UVA
7	Alfa-1-makroglobulin protein	gi 21955142	8	15353.8	5X ↓ u UVA
8	Sličan aneksinu A8	gi 34877045	241	37545	5X ↓ u UVA
9	Sličan vezujućem proteinu beta podjedinici	gi 55586343	129	30609.4	5X ↓ u UVA
10	Proteasomalna podjedinica	gi 38328483	120	29498.8	5X ↓ u UVA
11	Lanac A, Katehol O - metiltransferaza	gi 34811344	151	24731.4	5X ↓ u UVA
12	Sličan aktinu, alfa, srčani	gi 57108093	194	57647	5X ↓ u UVA
13	Kreatin kinaza	gi 6978661	123	42991.8	5X ↓ u UVA

4.5. Tekućinska kromatografija združena s masenom spektrometrijom (LC-MS)

Analogno analizi proteoma mrežnice uz pomoć metode 2-DE u kombinaciji s masenom spektrometrijom MALDI-TOF/TOF, provedena je i analiza ukupnog proteinskog sastava mrežnice uz pomoć metode tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Za potrebe analize korišteno je po 6 uzoraka iz svake skupine (kontrola, UVA i UVB). Ukupnom je analizom svih uzoraka identificirano 1246 proteina, pri čemu je postotak lažno pozitivnih identifikacija bio 18.4 % na razini proteina, te 5.3 % na nivou pojedinačnih peptida prema metodi Käll i suradnika (Käll i sur., 2008). Zanimljivo je istaknuti da je u obje studije pronađeno oko 50-tak zajedničkih proteina, što govori u prilog komplementarnosti korištenih metoda proteomike. Proteini identificirani metodom LC-MS, a koji imaju potencijalno važnu ulogu u patološkim promjenama u mrežnici oka štakora uslijed-UV zračenja sličnim kao i kod makularne degeneracije mogu se podijeliti u nekoliko skupina ovisno o funkcionalnom ili strukturnom značaju kako slijedi:

- **proteini važni za strukturu i funkciju mišićnih stanica:** miozin 1, 3, 4 i 7
- **strukturni proteini citoskeleta** (filamenti, mikrotubule, mikrofibrili): keratini tipa I i II, aktin, ezrin, profilin-1
- **metabolizam željeza:** hemoglobin podjedinice alfa i beta
- **proteini ekstracelularnog matriksa:** interfotoreceptorski matriks: asporin, periostin, dekorin, lumikan, prolargin, biglikan, galektin-7
- **proteini odgovora akutne faze i upalnih procesa:** C-reaktivni protein, alfa-1-makroglobulin, fetuin, serpin A1, serpin A3M
- **vezanje kalcija i signalni putevi kalcija:** kalretikulin, kalmodulin, kalneksin
- **epigenetska regulacija:** histoni H2B, H2A i H4
- **enzimi povezani s mijelinom/biljezi Müllerovih glija stanica:** karbonska anhidraza 2, izoforma 1 glia fibrilarnog kiselog proteina, hemopeksin, izoforma 1 gelsolina, izoforma 1 mijelin bazičnog proteina
- **proteini koji imaju neurozaštitnu ulogu:** inhibitorni faktor migracije makrofaga

- **ionski kanali/fototransdukcija:** kanali nadzirani naponom – anion-selektivni proteinski kanali 1 i 2
- **smatanje proteina/šaperoni:** kalneksin
- **proteini sa nepoznatom funkcijom:** transgelin-2, karbonska anhidraza 1 i 3.

Tablica 16. Popis jedinstvenih proteina koji su identificirani u kontrolnim uzorcima uz pomoć metode LC-MS. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa k/Da
1.	Brefeldin A	rr REV_Q9Y6D6 REV_BIG1_HUMAN	2	N/A
2.	26S proteasom ne-ATPazna regulatorna podjedinica	sp B0BN93 PSD13_RAT (+3)	7	43
3.	Masna Karboksipeptidaza A	sp P21961 CBPA3_RAT	6	48
4.	Izoforna 1 cink protein 13	sp Q5T200-1 ZC3HD_HUMAN (+1)	2	197
5.	Izoforna 1 UHRF1-vezajućeg proteina	sp A0JNW5-1 UH1BL_HUMAN (+2)	2	164
6.	C1q tumor nekrozni protein	tr B2RYB7 B2RYB7_RAT	1	31
7.	Nekarakteristični protein	tr Q9CPN9 Q9CPN9_MOUSE	1	26
8.	Werner sindrom ATP-ovisna helikaza	rr REV_O09053 REV_WRN_MOUSE (+4)	1	N/A
9.	Himaza	sp P50339 CMA1_RAT (+1)	3	28
10.	Protein jagged-1	rr REV_P78504 REV_JAG1_HUMAN (+2)	1	N/A
11.	Alkalna fosfataza	rr REV_D4ADM6 REV_D4ADM6_RAT	1	N/A

12.	NADH dehidrogenaza	sp Q9DC70 NDUS7_MO USE (+2)	2	25
13.	Makrofag receptor	sp Q9UEW3 MARCO_H UMAN (+1)	1	53
14.	Nekarakteristični protein	rr REV_D3ZDV3 REV_ D3ZDV3_RAT (+3)	1	N/A
15.	Nekarakteristični protein	tr Q4V7C3 Q4V7C3_RA T	1	99
16.	cDNA FLJ53194, sličan Caskin-2 proteinu	rr REV_B4DTT3 REV_ B4DTT3_HUMAN (+1)	1	N/A
17.	cDNA FLJ61514, sličan ADAM 28 proteinu	tr B4E0M3 B4E0M3_HU MAN	1	53
18.	Polimerni imunoglobulinski receptor	sp P01833 PIGR_HUMA N	2	83
19.	Izoforna 1 Myb-vezujućeg proteina 1A	sp Q9BQG0- 1 MBB1A_HUMAN (+2)	1	149
20.	Mitohondrijski karnitin	sp O43772 MCAT_HUM AN (+4)	1	33
21.	Intracelularni izmjenjivač kationa, tip A	sp A6ZIQ8 TM38A_RA T	1	33
22.	Staterin	sp P02808 STAT_HUM AN	1	7
23.	Aneksin A4	sp P55260 ANXA4_RAT (+1)	1	36
24.	DENN/MADD domena	rr REV_B0BNM5 REV_ B0BNM5_RAT	1	N/A
25.	Miozin-15	sp Q9Y2K3 MYH15_HU MAN	1	225
26.	UPF0554 protein	sp Q5HZX7 CB043_RA T	1	38
27.	Transmembranski protein 14C	sp Q9CQN6 TM14C_M OUSE (+2)	1	12
28.	Koenzim A ligaza	sp Q924N5 ACBG1_RA T (+1)	1	81
29.	Siderofleksin-3	sp Q9BWM7 SFXN3_H UMAN (+5)	1	36
30.	Transportni protein 6	sp Q9Y2P4 S27A6_HU MAN (+2)	1	70
31.	Metalopeptidaza 1	sp Q3UVK0- 1 ERMP1_MOUSE (+2)	1	100

32.	T-kompleks protein 11	sp Q8WWU5-1 TCP11_HUMAN (+8)	1	56
33.	Elongacijski čimbenik, protein	zz ZZ_FGCZCont0256	1	15
34.	Citoglobin	sp Q921A4 CYGB_RAT	1	21
35.	Biserni protein	rr REV_B5DEG9 REV_B5DEG9_RAT (+5)	1	N/A
36.	cDNA FLJ56258, sličan kancerogenim stanicama	tr B7Z765 B7Z765_HUMAN	1	112
37.	Apolipoprotein 0	sp Q9DCZ4 APOO_MOUSE (+2)	1	24
38.	MCG52719	rr REV_Q0VG34 REV_Q0VG34_MOUSE	1	N/A
39.	Nekarakteristični protein	tr D3ZAQ0 D3ZAQ0_RAT	1	16

Tablica 17. Popis jedinstvenih proteina koji su identificirani u grupi UVA uz pomoć metode LC-MS. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa k/Da
1.	Nekarakteristični protein	tr D3Z9F8 D3Z9F8_RAT	633	333
2.	Keratin, tip I	sp Q6IFW5 K1C12_RAT	169	49
3.	Alfa-2-makroglobulin	sp P06238 A2MG_RAT	98	164
4.	Keratocan	tr D3ZVD7 D3ZVD7_RAT	60	40
5.	Beta-kristalin B2	sp P62696 CRBB2_MOUSE (+1)	49	23
6.	Pirofosforilaza, UDP-glukoza	tr Q4V8I9 Q4V8I9_RAT	33	57
7.	Selen vezujući protein 1	sp Q8VIF7 SBP1_RAT	36	53
8.	Beta-kristalin A4	sp P56374 CRBA4_RAT	14	22
9.	Monoglicerid lipaza	sp Q8R431 MGLL_RAT (+1)	14	33
10.	Mijelinski	sp P60201-1 MYPR_HUMAN	12	30

	proteolipidni protein	(+2)		
11.	Gvanin nukleotidni vezajući protein	sp P54311 GBB1_RAT (+5)	8	37
12.	Proteoglikan 2, Perlekan	tr B1B0C7 B1B0C7_MOUSE (+1)	8	469
13.	Kolagen, alfa-2 lanac	sp P08122 CO4A2_MOUSE	10	167
14.	Gvanin nukleotidni vezajući protein, podjedinica alfa1	sp P11488 GNAT1_HUMAN (+2)	10	40
15.	Sličan ubikvitinu, enzim	sp Q5U300 UBA1_RAT	10	118
16.	Tubulin alfa, 4A lanac	sp P68366 TBA4A_HUMAN (+3)	9	50
17.	Nekarakteristični protein	tr D3ZED8 D3ZED8_RAT (+1)	7	45
18.	Fosfataza 2A, Serin/treonin-protein	sp P30153 2AAA_HUMAN (+6)	7	65
19.	Adenil-sukcinat sintetaza, izoforma 1	sp P28650-1 PURA1_MOUSE (+1)	9	50
20.	Bifunkcionalni purinski protein PURH	sp O35567 PUR9_RAT	8	64
21.	40S ribosomalni protein S18	sp P62269 RS18_HUMAN (+6)	3	18
22.	Proteasom, podjedinica beta tip3	sp P49720 PSB3_HUMAN (+1)	8	23
23.	Beta-manozidaza, izoforma 1	sp Q4FZV0-1 MANBA_RAT	6	101
24.	Protein kinaza C	tr B1WC34 B1WC34_RAT	7	59
25.	Rodopsin	sp P51489 OPSD_RAT	8	39
26.	Alkohol dehidrogenaza, klasa 4	sp P41682 ADH7_RAT	6	40
27.	Proteasom, podjedinica alfa	tr Q6IE67 Q6IE67_RAT (+4)	4	28
28.	Solute nosač	sp P11166 GTR1_HUMAN (+5)	6	54
29.	Beta-kristalin S	sp P0C5E9 CRBS_RAT	7	21
30.	Tiosulfat sulfurtransferaza	sp P24329 THTR_RAT	6	33
31.	D-beta-hidroksibutirat dehidrogenaza	sp P29147 BDH_RAT	8	38
32.	Nit1 protein	tr Q5PQK6 Q5PQK6_RAT	4	36
33.	Kelch ponavaljajuće i BTB domena	sp Q9ER30 KBTBA_RAT	6	68
34.	Na/K transportna	sp P07340 AT1B1_RAT (+1)	6	35

	ATP-aza			
35.	MCG49525	tr D3Z1I3 D3Z1I3_MOUSE (+17)	6	16
36.	Glikogenin-1	sp O08730 GLYG_RAT	7	37
37.	Peroksisomalni acil-koenzim A	sp P07872-1 ACOX1_RAT (+1)	7	75
38.	Gvanin nukleotidni vezajući protein, podjedinica alfa1	sp P09471-1 GNAO_HUMAN (+3)	7	40
39.	Peroksisomalni bifunkcionalni protein	sp P07896 ECHP_RAT	6	79
40.	BetaA2-kristalin	tr Q8CGQ0 Q8CGQ0_RAT	5	22
41.	Apolipoprotein A-I	sp Q8K4Z3 AIBP_MOUSE (+1)	4	31
42.	Ly6/Plaur domena, izoforma CRA_a	tr D4A707 D4A707_RAT	6	13
43.	Serpin H1	sp P19324 SERPH_MOUSE (+3)	6	47
44.	Akvaporin-1	sp P29975 AQP1_RAT (+1)	6	29
45.	C9 protein	tr Q5BKC4 Q5BKC4_RAT	5	64
46.	Endonukleazna domena	sp Q8C522 ENDD1_MOUSE (+1)	4	55
47.	Protein S100-A1	sp P35467 S10A1_RAT	6	11
48.	Dipeptidil peptidaza 1	sp P80067 CATC_RAT (+1)	6	52
49.	Retinol-vezujući protein 1	sp P02696 RET1_RAT (+1)	3	16
50.	Alkohol dehidrogenaza	sp P51635 AK1A1_RAT (+1)	6	37
51.	Elongacijski čimbenik 1-gama	sp P26641 EF1G_HUMAN (+2)	3	50
52.	Citokrom b-c1 kompleks, podjedinica 8	sp O14949 QCR8_HUMAN (+3)	4	10
53.	Nekarakteristični protein	tr D3ZPA9 D3ZPA9_RAT	4	56
54.	NADH-citokrom b5 reduktaza 3	sp P20070-1 NB5R3_RAT (+2)	6	34
55.	Proteasom, podjedinica alfa,tip1	sp P18420 PSA1_RAT (+5)	4	30
56.	Beta-kristalin B1	sp P02523 CRBB1_RAT	6	28
57.	Neuralna adhezijska molekula	sp P13595-1 NCAM1_MOUSE (+4)	6	119
58.	Nekarakteristični protein	tr D4A133 D4A133_RAT	5	68
59.	60S ribosomalni protein L12	sp P23358 RL12_RAT (+2)	2	18

60.	Ras-vezani protein Rab-7a	sp P09527 RAB7A_RAT (+2)	1	24
61.	Calsekvestrin-2	sp O14958 CASQ2	5	46
62.	Protein S100-B	sp P04271 S100B_HUM	6	11
63.	Hipoksantin-gvanin fosforibosiltransferaza	sp P00492 HPRT_HUMAN (+2)	5	25
64.	Nekarakteristični protein	tr D4A6I7 D4A6I7_RAT	5	13
65.	Nekarakteristični protein	tr D3ZUU6 D3ZUU6_RAT	5	22
66.	WD ponavljajući protein 1	sp Q5RKI0 WDR1_RAT	4	66
67.	1-acilglicerol-3-fosfat O-aciltransferaza	sp Q6QA69 ABHD5_RAT (+2)	5	39
68.	Gama-kristalin B	sp P10066 CRGB_RAT	4	21
69.	LIM i cistein domena, protein 1	sp Q8VEE1 LMCD1_MOUSE (+1)	4	41
70.	RGD1560775 protein	rr REV_A1A5Q3 REV_A1A5Q3_RAT (+2)	3	N/A
71.	Talin-1	sp P26039 TLN1_MOUSE (+2)	2	270 kDa
72.	Efrin, tipB receptor 6	sp O15197-2 EPHB6_HUMAN (+7)	2	81 kDa
73.	40S ribosomalni protein S13	sp P62277 RS13_HUMAN (+2)	2	17 kDa
74.	Nekarakteristični protein Col12a1	rr REV_D3Z9F8 REV_D3Z9F8_RAT (+5)	1	N/A
75.	Transkripcijski čimbenik	sp Q5NC05 TTF2_MOUSE (+2)	1	126 kDa
76.	Vakuolarni protein 13C	rr REV_Q709C8-1 REV_VP13C_HUMAN (+3)	1	N/A
77.	Gvanin nukleotidni vezujući protein	sp P63244 GBLP_HUMAN (+3)	4	35 kDa
78.	Prokolagen C-endopeptidaza	sp O08628 PCOC1_RAT (+7)	4	50 kDa
79.	40S ribosomalni protein S8	sp P62241 RS8_HUMAN (+8)	4	24 kDa
80.	Proteasom, podjedinica alfa, tip2	sp P17220 PSA2_RAT (+4)	4	26 kDa
81.	Nekarakteristični protein	tr D3ZUU8 D3ZUU8_RAT	4	47 kDa
82.	Koaktosin, sličan protein	sp B0BNA5 COTL1_RAT	3	16 kDa
83.	T-kompleks protein	sp P80313 TCPH_MOUSE (+5)	3	60 kDa
84.	Kinurenin, oksoglutarat transaminaza 3	sp Q58FK9 KAT3_RAT	3	51 kDa

85.	Grifin	sp Q9D1U0 GRIFN_MO	4	16 kDa
86.	Retinaldehid-vezajući protein 1	sp Q9Z275 RLBP1_MOUSE (+1)	3	36 kDa
87.	Beta-sinuklein	sp Q16143 SYUB_HUM	4	14 kDa
88.	Ubikvitin-protein ligaza E3C	rr REV_Q80U95 REV_UBE3C_MOUSE (+1)	3	N/A
89.	Nekarakteristični protein	rr REV_D4A8P9 REV_D4A8P9_RAT	1	N/A

Tablica 18. Popis jedinstvenih proteina koji su identificirani u grupi UVB uz pomoć metode LC-MS. Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI.

Broj	Protein	Pristupni broj	Postotak združivanja (<i>engl.</i> protein score)	Molekulska masa k/Da
1.	Brefeldin A	rr REV_Q9Y6D6 REV_BIG1_HUMAN	2	N/A
2.	Nekarakteristični protein	rr REV_C9JT59 REV_C9JT59_HUMAN (+10)	4	N/A
3.	Nekarakteristični protein	tr D4ABY7 D4ABY7_RAT	11	17
4.	Pde4dip protein	tr B2RUJ9 B2RUJ9_MOUSE (+9)	2	277
5.	Karnitin O-palmitoiltransferaza 2	rr REV_P18886 REV_CPT2_RAT	6	N/A
6.	Protein S100-A8	sp P05109 S10A8_HUMAN	8	11
7.	Apolipoprotein A-II	sp P04638 APOA2_RAT	10	11
8.	mali ubikvitin-vezajući protein 2	sp P61956 SUMO2_HUMAN (+4)	8	11
9.	Beta-globin	tr Q61650 Q61650_MOUSE	7	6
10.	Surfeit 2	tr Q6PCU1 Q6PCU1_RAT	1	29
11.	Hemoglobin, podjedinica beta	sp P04443 HBB0_MOUSE (+3)	4	16
12.	Kalcij aktivirana nukleotidaza 1	sp Q8K4Y7 CANT1_RAT (+3)	2	46

13.	Acetoacetyl-CoA sintetaza	sp Q9D2R0 AACS_MOUSE (+1)	3	75
14.	Nukleazni vezajući protein 1	sp P62960 YBOX1_MOUSE (+3)	6	36
15.	cDNA FLJ78440, sličan laktoferinu protein	tr A8K494 A8K494_HUMAN (+4)	5	78
16.	3,2-trans-enoil-CoA izomeraza	sp P42126-1 D3D2_HUMAN (+1)	2	33
17.	Nekarakteristični protein	tr D4A0W8 D4A0W8_RAT	1	69
18.	cDNA FLJ16223	tr Q6ZNC2 Q6ZNC2_HUMAN	1	31
19.	Sličan olfaktornom receptoru	tr O70265 O70265_RAT (+7)	1	38
20.	Vezikularni, membranski	sp O70404 VAMP8_MOUSE (+2)	3	11
21.	Keratin, tip I citoskeletni 14	sp P02533 K1C14_HUMAN	5	52
22.	Beta-globin	tr A8DUK2 A8DUK2_MOUSE	2	16
23.	Glikoziltransferaza, 48 kDa	sp O54734 OST48_MOUSE (+6)	1	49
24.	Adenilil ciklaza	rr REV_B4DNA3 REV_B	1	N/A
25.	Fibronektin, tip III	sp Q4ZHG4-1 FNDC1_HUMAN (+1)	1	206
26.	Centlein, izoforma 1	sp A2AM05-1 CNTLN	2	161
27.	Neutralna aminokiselina	sp Q63016 LAT1_RAT (+2)	2	56
28.	Fosfoglicerat mutaza	tr Q6P6G4 Q6P6G4_RAT (+1)	3	30
29.	ATP-citrat sintaza	sp Q91V92 ACLY_MOUSE	1	120
30.	Heparanaza	sp Q6YGZ1 HPSE_MOUSE	1	60
31.	Signalna peptidaza, podjedinica 3	rr REV_Q568Z4 REV_SPCS3_RAT (+1)	1	N/A
32.	SH3 vezujući protein	sp O75368 SH3L1_HUMAN (+2)	3	13
33.	Profilin-1	sp P07737 PROF1_HUMAN	3	15
34.	Acilfosfataza	tr D4A6X4 D4A6X4_RAT	3	11
35.	Kalumenin	tr Q3MID6 Q3MID6_RAT	3	37
36.	40S ribosomalni protein	tr D3ZMD2 D3ZMD2_RAT (+12)	3	14
37.	Bakar-transportni protein	sp O08997 ATOX1_MOUSE (+1)	3	7
38.	Ubikvitin-konjugirajući enzim	sp P68036 UB2L3_HUMAN (+4)	2	18

39.	Intraflagelarni transportni protein	sp O35594-1 IFT81_MOUSE (+1)	2	79
40.	Aminopeptidaza N	sp P15684 AMPN_RAT	3	109
41.	T-kininogen (T-KG)	tr Q63581 Q63581_RAT	2	48
42.	NADPH-citokrom P450 reduktaza	sp P00388 NCPR_RAT	2	77
43.	Nekarakteristični protein	sp Q8NAX2 CA172_HUMAN	1	44
44.	Hemoglobin, podjedinica beta-2	sp P02089 HBB2_MOUSE	2	16
45.	Plank protein	sp Q9NP55 PLUNC_HUMAN	2	27
46.	Lanac Ig alfa-2, C regija	sp P01877 IGHA2_HUMAN (+16)	2	37
47.	Klasterin	sp P05371 CLUS_RAT (+2)	2	51
48.	Hondroadherin	rr REV_O15335 REV_CHAD_HUMAN	2	N/A
49.	Stres inducirajući protein 70	sp P38647 GRP75_MOUSE	1	74
50.	Miozinski regulatorni laki polipeptid 9	sp P24844 MYL9_HUMAN (+2)	2	20
51.	Nekarakteristični protein	tr D4AA52 D4AA52_RAT	2	162
52.	Kalciklin-vezujući protein	sp Q6AYK6 CYBP_RAT	1	27
53.	Ect2 onkogen	rr REV_D3ZI55 REV_D3ZI55_RAT (+3)	2	N/A
54.	Katelicidin antimikrobni peptid	sp P49913 CAMP_HUMAN	1	19
55.	Ab2-371	rr REV_Q7TP38 REV_Q7TP38_RAT	1	N/A
56.	Kationski izmjenjivač, receptor	rr REV_O75762 REV_TRPA1_HUMAN	1	N/A
57.	Glikoziltransferaza	sp Q91YQ5 RPN1_MOUSE (+1)	1	69
58.	DnaJ	sp Q9QYI8 DNJB7_MOUSE (+1)	1	36
59.	B9-scFv	tr A2NN81 A2NN81_MOUSE (+29)	1	29
60.	MKIAA4226 protein	rr REV_Q571J3 REV_Q571J3_MOUSE	1	N/A
61.	Centrosomalni protein	rr REV_Q4V7C8 REV_CEP55_RAT (+3)	1	N/A

62.	ATP-vezajući transportni protein	tr Q6XBG3 Q6XBG3_MOUSE	1	192
63.	Nekarakteristični protein	rr REV_D3ZUU2 REV_D3ZUU2_RAT	1	N/A
64.	Imunoglobulin J, lanac	sp P01591 IGJ_HUMAN (+1)	1	18
65.	Alfa-1-kiseli glikoprotein 1	sp P02763 A1AG1_HUMAN (+2)	1	24
66.	Nukleolin	sp P13383 NUCL_RAT (+2)	1	77
67.	Ribonukleoprotein M	sp P52272-1 HNRPM_HUMAN (+6)	1	78
68.	Tubulin	sp Q5PPN5 TPPP3_RAT (+1)	1	19
69.	Ubikvilin-1	sp Q8R317-1 UBQL1_MOUSE (+2)	1	62
70.	Polipeptid N-acetilgalaktozaminiltransferaza	rr REV_B3KRZ8 REV_B3KRZ8_HUMAN (+2)	1	N/A
71.	Serotransferin	sp P02787 TRFE_HUMAN (+1)	1	77
72.	Mijeloperoksidaza	sp P05164-1 PERM_HUMAN (+8)	1	84
73.	60S ribosomalni protein	sp P35268 RL22_HUMAN (+4)	1	15
74.	Protein sličan NmrA	sp P86172 NMRL1_RAT (+6)	1	17
75.	Protein LZIC	sp Q5PQN7 LZIC_RAT (+3)	1	21
76.	GrpE, mitohondrijski	sp P97576 GRPE1_RAT (+1)	1	24
77.	Tiroidni receptor protein 11	sp Q15643 TRIPB_HUMAN (+15)	1	228
78.	Tenascin-N	sp Q9UQP3 TENN_HUMAN (+2)	1	144
79.	Spektrin beta lanac, eritrocitni	sp P11277-3 SPTB1_HUMAN (+6)	1	243
80.	AMY-1 pripadajući protein	sp Q7Z4T9-3 AAT1_HUMAN (+4)	1	83
81.	TBC1, član 25	sp A1A5B6 TBC25_MOUSE (+2)	1	83
82.	LOC683667	tr B0BNJ1 B0BNJ1_RAT	1	22
83.	LAG1	sp Q924Z4 LASS2_MOUSE (+3)	1	45
84.	Transmembranski protein 33	sp Q9CR67 TMM33_MOUSE (+4)	1	28

85.	Nekarakteristični protein	sp P0C7T7 CN082_HUMAN	1	39
86.	Diferencijacijski faktor 5	sp P43026 GDF5_HUMAN (+3)	1	55
87.	Kationski izmjenjivač, receptor	sp P48995-1 TRPC1_HUMAN (+5)	1	91
88.	NACHT, domene LRR I PID	rr REV_P59047 REV_NALP5_HUMAN	1	N/A
89.	Ubikvitin protein ligaza 2, WW domena	tr B4F767 B4F767_RAT	1	99
90.	Igh protein	tr Q6PIP8 Q6PIP8_MOUSE	1	51

5. RASPRAVA

Makularna degeneracija oka povezana sa starenjem (MD) se smatra glavnim uzrokom gubitka funkcije vida kod starije populacije, čije je liječenje otežano s obzirom na iznimno složenu prirodu bolesti i brojne potencijalne čimbenike rizika koji mogu doprinijeti njezinoj patogenezi uključujući dob, spol, rasu, izlaganje sunčevom svjetlu, prehranu, pušenje te kardiovaskularne bolesti (Donoso i sur., 2006). Patologiju ove bolesti karakteriziraju degenerativni procesi koji zahvaćaju fotoreceptore mrežnice, mrežnični pigmentni epitel i Bruchovu membranu, te promjene na koroidnim kapilarama. Terapija oboljelih od makularne degeneracije ovisi o vrsti makularne degeneracije. Suha makularna degeneracija ne može se izliječiti lijekovima, iako oboljeli na kraju ne moraju nužno u potpunosti izgubiti vid. Suha makularna degeneracija sporije napreduje od vlažnog oblika te se s ovim oblikom bolesti može duže normalno živjeti, posebice ako je zahvaćeno samo jedno oko. U usporavanju simptoma ovog oblika MD koriste se visoke doze antioksidanasa i cinka. Također se preporuča promjena prehrambenih navika, konzumiranje više voća i povrća koji su bogati vitaminima te konzumiranje omega-3 masnih kiselina. Prirodni antioksidansi usporavaju tijek bolesti i smanjuju oksidativni stres u stanicama mrežnice (Chiu i sur., 2009). Za osobe s uznapredovalom suhom makularnom degeneracijom u oba oka, rješenje za poboljšanje vida može biti operacija kojom se ugrađuju teleskopske leće u jedno oko. Liječenje vlažnog oblika makularne degeneracije uključuje klasične kirurške pristupe kao što su to primjerice laserski tretmani druzi, fotokoagulacija, fotodinamička terapija ali i primjena lijekova koji sprečavaju nastanak novih krvnih žila (primjerice monoklalnog antitijela bevacizumaba usmjerenog na faktor rasta VEGF). Svi ovi pristupi su se na žalost pokazali nedovoljno specifični u suzbijanju patoloških procesa ili značajnom poboljšanju vida kod oboljelih.

Novija istraživanja genetske i molekularne pozadine ove bolesti pridonijela su boljem razumijevanju patogeneze ove bolesti. Osobito su u tom kontekstu važni novootkriveni molekularni putevi i patofiziološki procesi uključeni u progresiju bolesti i odgovor na terapiju. Nova su saznanja prije svega omogućile moderne metode analize koje uključuju

visokoprotodne analitičke postupke (analize genoma i proteoma). Tako je primjerice, pokazano kako nespecifični imunološki sustav, te naročito nekontrolirana regulacija alternativnog puta aktivacije komplementa igra jednu od centralnih uloga u patobiologiji makularne degeneracije. Ključni dokazi za to svakako su otkriće proteina faktora komplementa u družama u očima oboljelih, te identifikacija glavnog rizičnog alela za makularnu degeneraciju, polimorfizma Y402H gena za komplement faktora H koji kodira glavni inhibitor alternativnog puta aktivacije komplementa (Edwards i sur., 2005). Stoga se smatra da deregulacija alternativnog puta aktivacije komplementa dovodi do lokalne i systemske upale u oboljelih. Nekoliko objavljenih istraživanja potvrdio je postojanje biomarkera upale u makularnoj degeneraciji (Gu i sur., 2010) a rezultati dobiveni u ovoj studiji analizom ekspresije proteina u mrežnici štakora kojima je inducirana makularna degeneracija (model *in vivo*) u skladu su s ovim saznanjem. Primjerice, uz pomoć metode tekućinske kromatografije u sprezi s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) identificirani su proteini važni za imunološki odgovor akutne faze poput C-reaktivnog proteina, alfa-1-makroglobulina i fetuina. Nadalje, ovo istraživanje je pokazalo i promjenu u razini ekspresije dvaju proteina iz porodice serpina, SERPINA1 (α -1-antitripsin) i Serpina3m. Serpini su inhibitori serinskih proteaza sa različitim biološkim funkcijama implicirani u patogenezi MD. Tako je primjerice utvrđeno da genetska varijacija u genu *SERPING1* značajno mijenja podložnost za nastanak makularne degeneracije (Ennis i sur., 2008). SERPING1 kodira C1 inhibitor koji ima ključnu ulogu u inhibiciji komponente 1 komplementa, što bi moglo implicirati i aktivaciju klasičnog puta komplementa u ovoj bolesti. Zanimljivo je, međutim, istaknuti da proteini SERPINA1 i Serpina3m, koji su identificirani u ovoj studiji, nisu do sada opisani niti u jednom modelu makularne degeneracije, te stoga njihova funkcionalna karakterizacija u makularnoj degeneraciji predstavlja veliki izazov.

Nadalje, pokazano je da je oksidativni stres važan čimbenik u etiologiji makularne degeneracije. Oksidativni stres u biti predstavlja neravnotežu pojave reaktivnih kisikovih vrsta i biološke sposobnosti organizma da se obrani od njih, detoksicira intermedijarne molekule u tim procesima ili da popravi nastala oštećenja. Stoga svaki poremećaj u redoks-statusu stanice dovodi do nastanka slobodnih radikala i peroksida koji mogu

poremetiti signalizaciju unutar stanica te uzrokovati razna oštećenja. U mrežničnom pigmentnom epitelu (RPE), oksidativni stres inducira signalne putove zaštite stanica, naročito PI3K/Akt i Nrf2 putove, ali i staničnu signalizaciju preko VEGF i neuroprotektina D1 (Klettner, 2012). Proteini iz porodice HSP (engl. Heat shock proteins) imaju citoprotektivne učinke na stanice RPE. U ovoj studiji identificiran je jedan protein HSP, α B kristalin koji je mitohondrijski i citosolni protein kojeg izlučuju stanice RPE pri čemu osigurava zaštitu od oksidativnog stresa (Yaung i sur., 2007). Naime, oksidativni stres dovodi do povećanog staničnog unosa i nakupljanja α B kristalina u citosolu i jezgrama stanica RPE (Sreekumar i sur., 2010). Slično našem istraživanju, Sakaguchi i sur., su 2003. detektirali povećanu ekspresiju α B kristalina u vanjskim segmentima fotoreceptorskih stanica u mrežnici te stanicama RPE nakon izlaganja mrežnice štakora jakim svjetlu. Nadalje, α B kristalin ima kritičnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa kojeg inducira NaIO_3 putem aktivacije kinaze Akt i ekspresije PPAR γ . Kinaza Akt izuzetno je važna signalna kinaza, primjerice unutar signalnog puta Akt/PKB mTOR, u stanicama čija je primarna uloga regulacija rasta, diobe stanica i apoptoze. Pokazano je da ekspresija egzogenog α -kristalina aktivira signalni put Akt kinaze koja potpomaže preživljavanje stanica RPE, a samim time i suzbija apoptozu induciranu zrakama UV A (Liu i sur., 2004). Akt/PKB mTOR signalni put sudjeluje u preživljavanju stanice kod direktnog utjecaja oksidativnog stresa. Ljudske RPE stanice sadrže dva funkcionalna kompleksa mTOR-a (mTORC1 i mTORC2). Dokazano je da smanjena regulacija mTORC1 može umanjiti starosne procese na primjeru RPE stanica (Chen i sur., 2010). Pri tome kod pigmentnih stanica epitela mrežnice, ovisno o samoj količini/dozi stresa i trajanju stresnog događaja dolazi do aktivacije ovoga signalnog puta čime se omogućava preživljavanje stanice. Inhibicijom ovoga signalnog puta povećava se apoptoza stanica, a visoka koncentracija vodikovog peroksida rapidno pojačava regulaciju i fosforilaciju puta mTOR i time također povećava apoptozu. Pri slabijoj aktivaciji oksidativnog stresa apoptoza je bila umjerene razine. Aktivacija kinaze Akt povećava postotak preživljavanja stanica RPE čime se potvrđuje zaštitna uloga ove kinaze kod makularne degeneracije (Faghiri i Bazan, 2010). Nadalje, pokazano je kako mTOR-posredovana de-diferencijacija pigmenta mrežnice pokreće degeneraciju fotoreceptora u mišu što potvrđuje ulogu ovog signalnog puta u procesima

degeneracije mrežnice. De-diferencijacija i hipertrofija RPE povećavaju se ukoliko se stimuliraju mete kinaze Akt važne u signalnom putu koji se aktivira davanjem lijeka rapamicina (AKT/mTOR). Stoga se može zaključiti kako je smisleno razvijati nove terapijske strategije za liječenje oboljelih od makularne degeneracije kojom bi se djelovalo ciljano na inhibiciju signalnog puta mTOR. Na taj način bilo bi moguće razviti novi lijek za liječenje stresom uvjetovane makularne degeneracije. U prilog uloge oksidativnog stresa u patogenezi makularne degeneracije govori i promjena ekspresije proteina detektiranog u ovoj studiji, aldehid dehidrogenaze A1 iz porodice aldehid dehidrogenaza 3 (ALDH3A1). Radi se o obilno zastupljenom proteinu u rožnici koji je zamijećen i u drugim slojevima oka. Ovaj protein ima važnu ulogu u zaštiti struktura oka od oksidativnog oštećenja uzrokovanog UV-zračenjem ili egzogenim toksinima tako što razgrađuje štetne aldehide (npr. 4-hidroksi-2-nonenal) nastale tijekom procesa peroksidacije lipida, te direktno apsorbira UV-zračenje (Pappa i sur., 2003). ALDH3A1 posjeduje i protuoksidativna svojstva, poznata kao direktna svojstva i indirektna svojstva. Direktna protuoksidativna uloga podrazumijeva uklanjanje slobodnih radikala, a indirektna proizvodnju NADPH koji također apsorbira UV-zračenje. Superoksid dismutaza 2 (SOD2), mitohondrijski oblik, katalizira pretvorbu anionskog superoksida i vode u hidrogen peroksid, te predstavlja prvu liniju obrane stanice od oksidativnog stresa. Dokazana je zaštitna uloga superoksid dismutaze kod apoptoze inducirane oksidacijom u pigmentnom epitelu mrežnice miša (Kasahara i sur., 2005).

Nadalje, prohibitin je protein kodiran evolucijski očuvanim genom. U stanici je ubikvitarno eksprimiran i ima ulogu negativnog regulatora stanične proliferacije a može djelovati i kao tumor supresor. Uključen je u signalne puteve oksidativnog stresa u mrežnici i pigmentnim epitelnim stanicama mrežnice (RPE). Regulacija prohibitina je rani signalni događaj u mrežnici kod aktivacije oksidativnog stresa te je povezana sa starosnim procesima kao i oksidativnim stresom uzrokovanim dijabetesom. Naime, u pigmentnim epitelnim stanicama mrežnice u starijih i dijabetičnih očiju štakora utvrđena je smanjena regulacija prohibitina, što korelira sa smanjenim stupnjem tj. koncentracijom prohibitina prilikom staničnog starenja (Schrier i Falk, 2011). Deplecija ekspresije ovog proteina uz pomoć metode male interferirajuće molekule RNK (siRNA) pokazala je da je

prohibitin molekula koja sprečava apoptozu u mitohondrijima te obavlja funkciju signalizacije između mitohondrija i jezgre stanice tijekom oksidativnog stresa. Stoga se prohibitin smatra važnim transkripcijskim regulatorom u mrežnici oka (Sripathi i sur., 2011). Naši su rezultati pokazali kako je ekspresija prohibitina smanjena u mrežnici štakora zračenih s UVA zrakama što je u skladu s literaturnim podacima i njegovoj zaštitnoj ulozi u stanicama oka. Zanimljivo je kako smo u ovoj studiji identificirali čitav niz strukturnih proteina poput strukturnih proteina citoskeleta (keratini tipa I i II, aktin, ezrin, profilin-1) te proteina izvanstaničnog matriksa (inter-fotoreceptorskog matriksa) poput asporina, periostina, dekorina, lumikana, prolargina, biglikana i galektina-7. Ekspresija ove grupe proteina se mijenjala u mrežnicama štakora zračenih s UVA i/ili s UVB zrakama. Poznato je naime da stanice RPE doprinose stvaranju i održavanju inter-fotoreceptorskog matriksa koji je neophodan za retinalnu adheziju i za proizvodnju čimbenika rasta. Inter-fotoreceptorski matriks ima brojne funkcije uključujući fizičku podršku fotoreceptorima, prijenos nutrijenata i vizualnih pigmenata te stvaranje adhezivnih veza između RPE i mrežnice. S obzirom da inter-fotoreceptorski matriks ima ključnu ulogu u retinalnoj adheziji i održavanje fotoreceptorskih stanica, moguće je da defekt u jednoj od komponenti inter-fotoreceptorskog matriksa može uzrokovati degenerativne promjene u retinalnim strukturama. Naša studija doista podupire mogućnost da proteini iz inter-fotoreceptorskog matriksa (IM) mogu potaknuti patogenezu makularne degeneracije. Slično su An i sur. utvrdili da RPE stanice iz područja makularne degeneracije donora izlučuju dva do tri puta više proteina IM uključujući protein koji veže galektin 3, fibronektin, klasterin, MMP-2 i čimbenik koji potječe iz RPE stanica u odnosu na zdrave donore (An i sur., 2006). Stoga bi ciljano djelovanje na komponente inter-fotoreceptorskog matriksa moglo usporiti patološke promjene u MD, te predstavljati jedan od mogućih modaliteta liječenja ove bolesti. Naročitu važnost pri tome bi mogao imati galektin-5, citosolni protein, član obitelji lektina koja veže na sebe β – galaktozidazu, a koji je prisutan na površini stanica štakorskih retikulocita i eritrocita. Galektin-5 u štakora djeluje unutar egzosomalnog signalnog puta tijekom sazrijevanja retikulocita (Barres i sur., 2010). S obzirom da galektin-5 nije do sada opisan u makularnoj degeneraciji, potrebna su dodatna istraživanja kojima bi se utvrdila njegova uloga u patogenezi ovog oboljenja u

čovjeka. Dobiveni rezultati podupiru hipotezu da proteini iz inter-fotoreceptorskog matriksa mogu potaknuti nastanak makularne degeneracije. Stoga predlažemo ovu grupu proteina kao metu za buduće liječenje oboljelih od ove bolesti što ćemo istražiti na novom modelu *in vivo*.

6. ZAKLJUČCI

- Po prvi puta primijenili smo model praćenja makularne degeneracije na štakorima. izazvane UV-zrakama. Model se pokazao pogodnim za proučavanje molekularnih procesa patogeneze degeneracije mrežnice. Analiza proteoma mrežnica štakora potvrdila je naime, prisutnost poznatih biljega makularne degeneracije kristalina i miozina.
- Uz pomoć metoda proteomike (dvodimenzionalna-gel elektroforeza 2-DE i tekućinska kromatografija LC u kombinaciji s masenom spektrometrijom) uspješno su identificirani proteini uključeni u patogenezu degeneracije mrežnice. Identificirani proteini diferencijalno ekspimirani u degeneriranoj mrežnici životinja sudjeluju u nizu različitih staničnih procesa uključujući metabolizam glukoze (glikoliza, glukoneogeneza), mitohondrijsku metaboličku aktivnost (citratni ciklus, oksidativna fosforilacija), apoptozu, proliferaciju, upalne procese, oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju, razgradnju neurotransmitera, prijenos signala u stanici (signalni put PI3K-Akt), kontrolu sinteze DNA i progresije staničnog ciklusa, strukturne komponente citoskeleta (aktinski filamenti), razgradnju proteina, metabolizam nukleotida i aminokiselina, komunikaciju između stanica, regulaciju smatanja proteina i fagocitozu.
- Metodološki pristup u kojem je korištena tekućinska kromatografija združena s masenom spektrometrijom rezultirala je značajno većim brojem identificiranih proteina (ukupno 1246 proteina) od metodološkog pristupa u kojem je korištena metoda 2-DE u kombinaciji s masenom spektrometrijom (ukupno 531 proteina).
- Globalne visokoprotodne proteomske metode analize mrežnice štakora zahvaćenih degenerativnim procesom omogućile su identifikaciju čitavog niza novih proteina i potencijalnih biljega uključenih u patogenezu degeneracije mrežnice (među inima SERPINA 1 i Serpina 3m, alfa i beta kristalina, ALDH3AI, Galektina 5 i 7 itd). Dobiveni rezultati podupiru hipotezu da proteini iz inter-fotoreceptorskog matriksa mogu potaknuti nastanak makularne degeneracije. Stoga predlažemo ovu grupu proteina kao metu za buduće liječenje oboljelih od ove bolesti.

7. LITERATURA

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207

Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Lanchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*. 2003; 48(3):257-93

An E, Lu X, Flippin J, Devaney JM, Halligan B, Hoffman EP, Strunnikova N, Csaky K, Hathout Y. Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. *J Proteome Res*. 2006 Oct;5(10):2599-610

Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1986 May;104(5):694-701

Au Eong KG, Maheshwar B, Beatty S, Haller JA. Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration and Choroidal Neovascularization, 2008

Austin BA, Liu B, Li Z, Nussenblatt RB. Biologically active fibronectin fragments stimulate release of MCP-1 and catabolic cytokines from murine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jun;50(6):2896-902. Epub 2009 Jan 17

Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*. 2000 Nov 18;356(9243):1749-56

Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, André S, Mamoun R, Gabius HJ, Vidal M. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):696-705. Epub 2009 Nov 10

Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 1999 Jul;83(7):867-77

Bernstein PS, Balashov NA, Tsong ED, Rando RR. Retinal tubulin binds macular carotenoids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Jan;38(1):167-75

Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)*. 2001 Jun;15(Pt 3):384-9

Buch H, Vinding T, La Cour M, Appleyard M, Jensen GB, Nielsen NV. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology*. 2004 Jan;111(1):53-61

Busch ME, Gorgels TG, van Norren D. Temporal sequence of changes in rat retina after UV-A and blue light exposure. *Vision Research* 39 (1999) 1233-1247

Chakravarti A. Population genetics – making sense out of sequence. *Nat Genet* (1999) 21 : 56–60

Chau KY, Sivaprasad S, Patel N, Donaldson TA, Luthert PJ, Chong NV. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye*, 2008: Issue 22(6): Page 855-9

Chen M, Forrester JV, Xu H. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res*. 2007 Apr;84(4):635-45. Epub 2006 Dec 31

Chen Y, Wang J, Cai J, Sternberg P. Altered mTOR signaling in senescent retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Oct;51(10):5314-9. Epub 2010 May 5

Chiu CJ, Klein R, Milton RC, Gensler G, Taylor A. Does eating particular diets alter the risk of age-related macular degeneration in users of the Age-Related Eye Disease Study supplements? *Br J Ophthalmol.* 2009 Sep;93(9):1241-6. Epub 2009 Jun 9

Christen WG, Glynn RJ, Manson JE, Ajani UA, Buring JE. A prospective study of cigarette smoking and risk of age-related macular degeneration in men. *JAMA* 1996; 276: 1147–1151

Churei H, Ohkubo K, Nakajo M, Hokotate H, Baba Y, Ideue J, Miyagawa K, Nakayama H, Hiraki Y, Kitasato T, Yabe N. External-beam radiation therapy for age-related macular degeneration: two years' follow-up results at a total dose of 20 Gy in 10 fractions. *Radiat Med.* 2004 Nov-Dec;22(6):398-404

Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG (2002) Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 14 682–14 687

Curcio CA, Millican CL. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 1999 Mar;117(3):329-39

Curcio CA, Saunders PL, Younger PW, Malek G. Peripapillary chorioretinal atrophy: Bruch's membrane changes and photoreceptor loss. *Ophthalmology.* 2000 Feb;107(2):334-43

Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol.* 1990 Feb 22;292(4):497-523

Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2006 Mar-Apr;51(2):137-52

Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, Tam PO, Chan WM, Lam DS, Snyder M, Barnstable C, Pang CP, Hoh J. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):989-92

Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):421-4. Epub 2005 Mar 10

Eichenbaum D, Reichel E. *Optical Coherence Tomography in the Evaluation and Management of Age-Related Macular Degeneration*, Chapter 10, Age-related macular degeneration, Informa Healthcare USA, 2008

Ennis S, Jomary C, Mullins R, Cree A, Chen X, Macleod A, Jones S, Collins A, Stone E, Lotery A. Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study. *Lancet*. 2008 Nov 22;372(9652):1828-34. Epub 2008 Oct 6

Estey T, Piatigorsky J, Lassen N, Vasiliou V. ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Exp Eye Res*. 2007 Jan;84(1):3-12. Epub 2006 Jun 21

Ethen CM, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Declines in arrestin and rhodopsin in the macula with progression of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Mar;46(3):769-75

Faghiri Z, Bazan NG. PI3K/Akt and mTOR/p70S6K pathways mediate neuroprotectin D1-induced retinal pigment epithelial cell survival during oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Eye Res.* 2010 Jun;90(6):718-25. Epub 2010 Mar 15

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806–11

Fort PE, Lampi KJ. New focus on alpha-crystallins in retinal neurodegenerative diseases. *Exp Eye Res.* 2011 Feb;92(2):98-103. Epub 2010 Nov 27

Francis PJ. The influence of genetics on response to treatment with ranibizumab (Lucentis) for age-related macular degeneration: the lucentis genotype study (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2011 Dec;109:115-56

Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J; Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004 Apr;122(4):564-72

Friedman JS, Faucher M, Hiscott P, Biron VL, Malenfant M, Turcotte P, Raymond V, Walter MA. Protein localization in the human eye and genetic screen of opticin. *Hum Mol Genet.* 2002 May 15;11(11):1333-42

Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, Fujimoto JG, Avery RL, Arrigg PG, Bursell SE, Aiello LP, Feener EP. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):181-8. Epub 2007 Jan 28

Gass JD. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium. *Am J Ophthalmol.* 1967 Mar;63(3):Suppl:1-139

Gisbert R. Fluorescein and ICG Angiography, THIEME 1998

Glickman RD. Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage *International Journal of Toxicology* 21 (2002) 473-490

Goldstein M, Loewenstein A, Barak A, et al. Results of a multicenter clinical trial to evaluate the preferential hyperacuity perimeter for detection of age-related macular degeneration. *Retina* 2005; 25:296–303

Gorgels TG, Van Norren D. Two spectral types of retinal light damage occur in albino as well as in pigmented rat: no essential role for melanin. *Experimental Eye Research*, Volume 66, Issue 2, February 1998, Pages 155-162

Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. *Ophthalmology.* 1993 Oct;100(10):1519-35

Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004 Dec 30;351(27):2805-16

Green WR, Key SN 3rd. Senile macular degeneration: a histopathologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1977; 75:180–254

Grunwald JE, Piltz J, Hariprasad SM, DuPont J. Optic nerve and choroidal circulation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Nov;39(12):2329-36

Gu J, Pauer GJ, Yue X, Narendra U, Sturgill GM, Bena J, Gu X, Peachey NS, Salomon RG, Hagstrom SA, Crabb JW; Clinical Genomic and Proteomic AMD Study Group.

Proteomic and genomic biomarkers for age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2010;664:411-7

Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI et al. From the cover: a common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7227–7232

Hiramitsu T, Armstrong D. Preventive effect of antioxidants on lipid peroxidation in the retina. *Ophthalmic Res.* 1991;23(4):196-203

Husain D, Kramer M, Kenny AG, Michaud N, Flotte TJ, Gragoudas ES, Miller JW. Effects of photodynamic therapy using verteporfin on experimental choroidal neovascularization and normal retina and choroid up to 7 weeks after treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Sep;40(10):2322-31

Jampel HD, Chen X, Chue C, Zack DJ. Expression of carbonic anhydrase isozyme III in the ciliary processes and lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997 Feb;38(2):539-43

Junqueira CL, Carneiro J. *Osnove histologije. Školska knjiga, 2005, Zagreb*

Kanski J. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach, 2006*

Kasahara E, Lin LR, Ho YS, Reddy VN. SOD2 protects against oxidation-induced apoptosis in mouse retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Sep;46(9):3426-34

Käll L, Storey JD, MacCoss MJ, Noble WS. Assigning significance to peptides identified by tandem mass-spectrometry using decoy databases. *J Proteome Res.* 2008 Jan;7(1):29-34. Epub 2007 Dec 8

Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)*. 2010 Feb;25(1):8-15

Khan C, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates WRJ, Bradley M, Moore TA, Bird CA. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *J Ophthalmol*. 90 (2006) 75-80

Khan JC, Shahid H, Thurlby DA, Bradley M, Clayton DG, Moore AT, Bird AC, Yates JR, Genetic Factors in AMD Study (January 2006). Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight. *The British Journal of Ophthalmology* 90 (1): 29–32

Kindzelskii AL, Elner VM, Elner SG, Yang D, Hughes BA, Petty HR. Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. *J Gen Physiol*. 2004 Aug;124(2):139-49

Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol*. 1998 May;116(5):653-8

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308: 385–389

Kobayashi H, Kobayashi K. Age-related macular degeneration: long-term results of radiotherapy for subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol*. 2000 Nov; 130 (5):617-35

Klettner A. Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012 Jan 1;4:392-411

Kraljević Pavelić S, Pavelić K. Novo doba molekularne medicine: dometi proteomike. *Medicina*, 2009. Vol. 45, No. 3, p. 208-210

Kraljevic Pavelic S, Saban N. Evolving ‘-omics’ technologies in the drug development process. *Expert Opin Drug (2007) Disc 2*: 431-436

Kraljević Pavelić S., Sedić M., Hock K., Vučinić S., Jurišić D., Gehrig P., Scott M., Schlapbach R., Čačev T., Kapitanović S., Pavelić K.: An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Pathology* 217, 4; (2009) 524-533

Lander E. The new genomics: global views of biology. *Science* (1996) 274 : 536–539

Lederman M, Weiss A, Chowers I. Association of neovascular age-related macular degeneration with specific gene expression patterns in peripheral white blood cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jan;51(1):53-8. Epub 2009 Aug 13

Lee H, Arnouk H, Sripathi S, Chen P, Zhang R, Bartoli M, Hunt RC, Hrushesky WJ, Chung H, Lee SH, Jahng WJ. Prohibitin as an oxidative stress biomarker in the eye. *Int J Biol Macromol*. 2010 Dec 1;47(5):685-90. Epub 2010 Sep 9

Lim JI. Age-related macular degeneration, Informa Healthcare USA, 2008

Litman BJ, Mitchell DC. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids*. 1996 Mar;31 Suppl:S193-7

Liu JP, Schlosser R, Ma WY, Dong Z, Feng H, Liu L, Huang XQ, Liu Y, Li DW. Human alphaA- and alphaB-crystallins prevent UVA-induced apoptosis through regulation of PKC α , RAF/MEK/ERK and AKT signaling pathways. *Exp Eye Res*. 2004 Sep;79(3):393-403

Liversidge J, McKay D, Mullen G, Forrester JV. Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE2 and membrane-bound mechanisms. *Cell Immunol.* 1993 Jul;149(2):315-30

Loewenstein A, Malach R, Goldstein M, et al. Replacing the Amsler grid: a new method for monitoring patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2003; 110:966–70

Losonczy G, Fekete Á, Vokó Z, Takács L, Káldi I, Ajzner É, Kasza M, Vajas A, Berta A, Balogh I. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol.* 2011 May;89(3):255-62

Macular Photocoagulation Study Group: Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy: three-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol* 1986;104:694-701

Maier P, Unsoeld AS, Junker B, et al. Intravitreal injection of specific receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ ZK222 584 improves ischemia-induced retinopathy in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243:593–6

Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006; 38: 1055–1059

Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM (2007). Variation in Complement Factor 3 is Associated with Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Nature Genetics* 39 (10): 1200–1201

Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic.* 2001 Dec;2(12):867-72

Martínez-Barricarte R, Recalde S, Fernández-Robredo P, Millán I, Olavarrieta L, Viñuela A, Pérez-Pérez J, García-Layana A, Rodríguez de Córdoba S; the Spanish Multicenter Group on AMD. Relevance of Complement Factor H-Related 1 (CFHR1) Genotypes in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Mar 1;53(3):1087-1094. Print 2012

Moore KS, Wehrli S, Roder H, et al. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1354–8

Nicolas MG, Fujiki K, Murayama K, Suzuki MT, Mineki R, Hayakawa M, Yoshikawa Y, Cho F, Kanai A. Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. I. Abnormal concentrations of two proteins in the retina. *Exp Eye Res.* 1996 Mar;62(3):211-9

Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol.* 1966 Oct;5(5):450-73

Nordgaard CL, Berg KM, Kapphahn RJ, Reilly C, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Proteomics of the retinal pigment epithelium reveals altered protein expression at progressive stages of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Mar;47(3):815-22

Oeller J. Atlas Seltener Ophthalmoscopischer Befunde. Wiesbaden: Bergmann JF, 1905

Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Aug;40(9):1891-8

Okamoto H, Umeda S, Nozawa T, Suzuki MT, Yoshikawa Y, Matsuura ET, Iwata T. Comparative proteomic analyses of macular and peripheral retina of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim.* 2010;59(2):171-82

Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, et al. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 2000; 156:697–707

Pagenstecher H, Genth CP. *Atlas Der Pathologischen Anatomie Des Augapfels*. Wiesbaden: CW Kreiden, 1875

Pappa A, Chen C, Koutalos Y, Townsend AJ, Vasiliou V. Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 2003 May 1;34(9):1178-89

Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2001 May;20(3):385-414

Pleština S, Samaržija M, Pleština S, Chalfe N, Žuljević E. Erlotinib u liječenju bolesnika s uznapredovalim karcinomom pluća nemalih stanica: Iskustvo Kliničke bolnice za plućne bolesti „Jordanovac“. *Lij Vjesn* 2007;129:387–390

Rakheja D, Bennett MJ, Rogers BB. Long-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency: a molecular and biochemical review. *Lab Invest*. 2002 Jul;82(7):815-24

Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, et al. Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* 2001; 2:2029–32

Rayborn ME, Sakaguchi H, Shadrach KG, Crabb JW, Hollyfield JG. Annexins in Bruch's membrane and drusen. *Adv Exp Med Biol*. 2006;572:75-8

Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 2003;9:210–6

Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19 (49) (2000): 5548–5557

Roomets E, Kivelä T, Tyni T. Carnitine palmitoyltransferase I and Acyl-CoA dehydrogenase 9 in retina: insights of retinopathy in mitochondrial trifunctional protein defects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Apr;49(4):1660-4

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. MARINA Study Group. *N Engl J Med.* 2006 Oct 5; 355(14):1419-31

Sakaguchi H, Miyagi M, Darrow RM, Crabb JS, Hollyfield JG, Organisciak DT, Crabb JW. Intense light exposure changes the crystallin content in retina. *Exp Eye Res.* 2003 Jan;76(1):131-3

Saliba RS, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J Cell Sci.* 2002 Jul 15;115(Pt 14):2907-18

Sarangarajan R, Apte SP: Melanin Aggregation and Polymerization: Possible Implications in Age-Related Macular Degeneration *Ophthalmic Research*, 2005; volume 37: pages 136-141

Schrier SA, Falk MJ. Mitochondrial disorders and the eye. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011 Sep;22(5):325-31

Schütt F, Davies S, Kopitz J, Holz FG, Boulton ME. Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Jul;41(8):2303-8

Seddon JM, Reynolds R, Rosner B. Associations of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LIPC gene variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2010 Nov 17;16:2412-24

Sedić M. Biološki učinci novog amidino-supstituiranog-benzimidazo[1, 2-a] kinolina na tumorske stanične linije debelog crijeva čovjeka u uvjetima in vitro / doktorska disertacija. Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, 15.11. 2006, 103 str.

Sedic M, Kraljevic Pavelic S, Cindric M, Vissers JP, Peronja M, Josic D, Cuk M, Fumic K, Pavelic K, Baric I. Plasma biomarker identification in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Electrophoresis*. 2011 Aug;32(15):1970-5. doi: 10.1002/elps.201000556. Epub 2011 Jul 6

Shen J, Samul R, Silva RL, et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006; 13:225–34

Shi Z, Rudzinski M, Meerovitch K, Lebrun-Julien F, Birman E, Di Polo A, Saragovi HU. Alpha2-macroglobulin is a mediator of retinal ganglion cell death in glaucoma. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):29156-65. Epub 2008 Aug 13

Sills AK, Williams JI, Tyler BM, et al. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. *Cancer Res* 1998; 58:2784–92

Singh RP, Chung JY. Fundus Autofluorescence in Age-Related Macular Degeneration, Chapter 12, Age-related macular degeneration, Informa Healthcare USA, 2008

Solomon SD, Jefferys JL, Hawkins BS, Bressler NM. Incident choroidal neovascularization in fellow eyes of patients with unilateral subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: SST report No. 20 from the Submacular Surgery Trials Research Group. *Arch Ophthalmol*. 2007 Oct;125(10):1323-30

Sreekumar PG, Kannan R, Kitamura M, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Hinton DR. α B crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells. *PLoS One*. 2010 Oct 8;5(10):e12578

Sripathi SR, He W, Atkinson CL, Smith JJ, Liu Z, Elledge BM, Jahng WJ. Mitochondrial-nuclear communication by prohibitin shuttling under oxidative stress. *Biochemistry*. 2011 Oct 4;50(39):8342-51. Epub 2011 Sep 12

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):845-81

Strauss O. The role of retinal pigment epithelium in visual functions. *Ophthalmologie*. 2009 Apr;106(4):299-304

Sunness JS. The natural history of geographic atrophy, the advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 1999 Nov 3;5:25

Sunness JS, Rubin GS, Broman A, Applegate CA, Bressler NM, Hawkins BS. Low luminance visual dysfunction as a predictor of subsequent visual acuity loss from geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2008 Sep;115(9):1480-8, 1488.e1-2. Epub 2008

Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, et al. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24:132–8

Tyni T, Paetau A, Strauss AW, Middleton B, Kivelä T. Mitochondrial fatty acid beta-oxidation in the human eye and brain: implications for the retinopathy of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res*. 2004 Nov;56(5):744-50. Epub 2004 Sep 3

Uehara F, Ohba N, Ozawa M. Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Sep;42(10):2164-72

Vojniković B. Age-related macular degeneration is not macular process only - peripheral retina is attacked too. *Coll Antropol.* 2007 Jan;31 Suppl 1:3-5

Vojniković B, Njirić S, Coklo M, Spanjol J. Ultraviolet sun radiation and incidence of age-related macular degeneration on Croatian Island Rab. *Coll Antropol.* 2007 Jan;31 Suppl 1:43-4

Vorum H, Østergaard M, Rice GE, Honoré B, Bek T. Identification of differentially regulated proteins in a patient with Leber's Congenital Amaurosis--a proteomic study. *Proteome Sci.* 2007 Feb 27;5:5

Wiegand RD, Giusto NM, Rapp LM, Anderson RE. Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 (1983) 1433-1435

Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 1999 Nov 3;5:32

Wolfensberger TJ, Mahieu I, Jarvis-Evans J, Boulton M, Carter ND, Nógrádi A, Hollande E, Bird AC. Membrane-bound carbonic anhydrase in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 Aug;35(9):3401-7

Wu J, Seregard S, Algvere PV. Photochemical damage of the retina. *Survey of Ophthalmology* 51 (5) (2006) 461-481

Xi J, Farjo R, Yoshida S, Kern TS, Swaroop A, Andley UP. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina. *Mol Vis.* 2003 Aug 28;9:410-9

Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X, Chien J, Dewan A, Harmon J, Bernstein PS, Shridhar V, Zabriskie NA, Hoh J, Howes K, Zhang K. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):992-3

Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007; 357: 553–561

Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT (2007). Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 357 (6): 553–561

Yaung J, Jin M, Barron E, Spee C, Wawrousek EF, Kannan R, Hinton DR. alpha-Crystallin distribution in retinal pigment epithelium and effect of gene knockouts on sensitivity to oxidative stress. *Mol Vis*. 2007 Apr 4;13:566-77

Ying M, Fuller J, Alexander J, Sheils W, Lee Y, Marcus D. Multimodality transpupillary thermotherapy and radiotherapy of occult subfoveal choroidal neovascular membranes in AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45

Yoshida S, Yashar BM, Hiriyanna S, Swaroop A Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2002) 43 : 2554–2560

Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr. Relat. Cancer* 8 (3) (2001): 161–173

<http://parkslopeeye.wordpress.com/tag/optical-coherence-tomography/>

<http://www.osnsupersite.com>

<http://www.seewithlasik.com/docs/macular-degeneration-treatments.html>

<http://www.twoj-lekarz.com.pl/artykuly/badania-diagnostyczne/sadzisz-ze-masz-amd-wykonaj-test-amslera>

8. SAŽETAK

Makularna degeneracija oka uzrokuje ireverzibilni gubitak centralnog vida u osoba starijih od 50 godina te je jedna od najčešćih uzročnika sljepoće u ljudi starije životne dobi. Nastanak makularne degeneracije vezan je uz niz čimbenika poput nasljedne predispozicije, životne dobi te UV-zračenja. U sklopu ovog istraživanja uspostavili smo animalni model na štakoru za proučavanje makularne degeneracije. Pokusnim zračenjem oka štakora s UVA i UVB zrakama pratili smo molekularne mehanizme nastanka degeneracije mrežnice na razini proteoma uz pomoć metoda dvodimenzionalne-gel elektroforeze te tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom, te bioinformatičkom analizom. Utvrdili smo pritom nove proteinske biljege za razvoj ove bolesti, a odabrani biljezi će se naknadno validirati s ciljem predlaganja novih prognostičkih i/ili terapijskih meta za makularnu degeneraciju.

9. SUMMARY

Macular degeneration is the leading cause of irreversible central vision loss in humans over 50 years of age and is one of the leading causes of blindness in elders. Development of macular degeneration involves a variety of factors including hereditary predisposition, age and radiation. As a part of presented study, the rat animal model was established. Animal eyes were irradiated with UVA and UVB rays to determine the molecular mechanisms underlying retinal degeneration on the proteome level by using large-scale proteomics methods (two dimensional gel-electrophoresis and liquid chromatography combined with mass spectrometry and bioinformatic analysis). Protein markers were determined and subsequently will be validated in order to propose novel prognostic and/or therapeutic targets for macular degeneration.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Srđan Vučinić

Adresa: Zvonimira Cimermančića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Telefon: 091/7980 514

Telefaks:

Elektronička pošta: svucinic@irb.hr

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum rođenja: 23.5.1977.

Matični broj iz upisa znanstvenika: 287286

Radno iskustvo:

Datum zaposlenja: 18.4.2006.

Ustanova zaposlenja: HAZU, Zagreb

Naziv radnog mjesta: Znanstveni novak

Područje rada: Biomedicina

Znanstvene aktivnosti :

- Istraživanje mehanizma nastanka Dupuytren-ove kontrakture
- Proteomika tkiva i krvne plazme
- Spektrometrija masa
- Animalna proteomika

Znanstveni interesi:

Primjena i razvoj metoda proteomike (dvodimenzionalna elektroforeza i masena spektrometrija / MALDI -TOF/TOF MS) u biomedicinskim istraživanjima:

- istraživanje molekularne osnove nastanka Dupuytrenove bolesti
- molekularno profiliranje metastazirajućeg tumora dojke
- molekularna osnova aseptičke nestabilnosti totalne endoproteze zgloba kuka
- molekularni mehanizmi nastanka prekanceroznih i kanceroznih lezija usne šupljine
- molekularni mehanizmi nastanka makularne degeneracije oka u štakora
- istraživanje molekularne osnove nastanka posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP)
- istraživanje molekularne osnove nastanka deformacija skeletno - mišićnog sustava u riba
- istraživanje molekularne osnove nastanka Niemann-Pick bolesti
- istraživanje struktura i funkcija telomera u kontroli staničnog rasta
- proteomska istraživanja učinaka antitumorskih spojeva na različitim staničnim kulturama (stanice raka debelog crijeva, stanice karcinoma pluća, stanice raka grkljana i vrata...)
- proteomika farmskih životinja

Školovanje :

Datum stjecanja diplome: 2004.

Naslov: *Ceratohoa oestroides*, nametnik na bukvi (*Boops boops* L.) i giri oblici (*Spicara smaris* L.)

Mjesto: Zagreb

Ustanova: Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Zvanje: dr.vet.med.

Osobne vještine i kompetencije :

Materinji jezik: Hrvatski

Strani jezici: Engleski i talijanski (govori, piše i čita)

Socijalne vještine i kompetencije :

Komunikativan, vješt u radu s ljudima, uspješno ostvaruje suradnje.

Organizacijske vještine i kompetencije :

Vješt u organizaciji kongresa i izvođenju laboratorijskih poslova. Trenutno radi istraživačke aktivnosti iz područja proteomskih istraživanja u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, Zagreb.

Kongresi:

Član organizacijskog odbora:

- Applications of Functional Genomics to Biomedical Research, workshop, 20. - 23.6.2008., Cavtat, Hrvatska
- Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković, 24. - 26.4.2008., Zagreb, Hrvatska
- Applications of Functional Genomics to Biomedical Research, workshop 10. - 12.11.2006., Cavtat, Hrvatska

Tehničke vještine i kompetencije :

Rad na računalu (sučelje MS Windows). Odlično poznaje rad u programima Excel, Access, Word. Obučen je za rad u specijaliziranim programima za analizu rezultata dobivenih metodom dvodimenzionalne gel-elektroforeze te Western blota (program PDQuest, Quantity One).

Vozačka dozvola: B kategorija

Znanstvena djelatnost:

Poglavlja u knjizi:

1. Kozarić-Kovačić, Dragica; Pavelić, Krešimir; Filipac, Vanda; Cindrić, Mario; **Vučinić, Srđan**; Kraljević Pavelić, Sandra, “*Proteomics and Posttraumatic Stress Disorder (PTSD)*” // *Coping with Posttraumatic Stress Disorder in Returning Troops: Wounds of War II / Wiederhold, Brenda, K ; (ur.). Amsterdam, Berlin, Tokio, Washington D.C. : IOS Press, 2010. Str. 57-61.*

Popis radova indeksiranih u CC :

1. Sandra Kraljevic Pavelic, Mirela Sedic, Karlo Hock, **Srđan Vucinic**, Davor Jurisic, Peter Gehrig, Mike Scott, Ralph Schlapbach, Tamara Cacev, Sanja Kapitanovic and Kresimir Pavelic ,“*An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren’s disease*”, J Pathol 2009.
2. Ratkaj I, Stajduhar E, **Vucinic S**, Spaventi S, Bosnjak H, Pavelic K, Kraljevic Pavelic S, “*Integrated gene networks in breast cancer development*”, Funct Integr Genomics, 2010.

Originalni znanstveni radovi :

1. Nevijo Zdolec, Vesna Dobranić, Anita Horvatić, **Srđan Vučinić**, “Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages”, International Food Research Journal, 2012.
2. Sedić, Mirela; Kraljević Pavelić, Sandra; **Vučinić, Srđan**, Pavelić; Krešimir “*Unravelling new pieces of tumour metastasis puzzle: the role of proteomics*” // Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti. 35 (2010) ; 13-28
3. Z. Matasin, **S. Vucinic**, “*Ceratothoa oestroides (Risso, 1826) in bogue (Boops boops L.) and picarel (Spicara smaris L.) from the Velebit channel in the Northern Adriatic*”, Veterinarski arhiv, 78 (4)

Sažeci u zbornicima skupova :

1. **Vučinić, Srđan** “*Proteomika - Veterinomika - "novi" koncepti u medicini*” // The International Congress "Veterinary science and profession" / Veterinarski fakultet (ur.). Zagreb : Veterinarski fakultet, 2011. 68-68.
2. Filipac, Vanda; Cindrić, Mario, **Vučinić, Srđan**; Vidović, Anđelko; Kozarić-Kovačić, Dragica. “*Proteomska analiza uzoraka seruma u oboljelih od Posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP-a)-Pilot studija*” // Zbornik 5. hrvatskog psihijatrijskog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik : HPD, 2010. 32-32.
3. **Vučinić S**, Vojniković B, Cindrić M, Bratulić S, Kraljević Pavelić S., “*Proteomic profiling of rat retina – a model for studying the macular degeneration pathogenesis*”, 3rd International Congress of Croatian Association for Protection of Non Ionizing Radiation, IVth Meeting of Experts for Influence in Optical Radiations & Electromagnetic Fields on Human, 1st Meeting of Experts for the Quality of Life Problems in the Senior Population, Opatija, Hrvatska, 23.10. – 25.10. 2009.
4. Pokos, Vanda; Cindrić, Mario; **Vučinić, Srđan**; Vidović, Anđelko; Kozarić-Kovačić, Dragica., “*Proteomska analiza seruma osoba s posttraumatskim stresnim poremećajem - pilot*” // Knjiga sažetaka 4. hrvatskog simpozija o poremećajima uzrokovanim stresom - Stres i zdravlje / Kozarić-Kovačić, Dragica (ur.), Zagreb : KB Dubrava, 2009. 63.
5. Sedić, Mirela; Cindrić, Mario; Peronja, Marija; Ćuk, Mario; Barić Ivo; **Vučinić, Srđan**; Kraljević Pavelić, Sandra., “*Proteomic analysis of plasma from infants with S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency*” // 3rd Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Dubrovnik. Dubrovnik, 2009.
6. N. Saban, **S. Vucinic**, B. Zorc, I. Perkovic, I. Butula, M. Mintas, S. Kraljevic Pavelic, “*Biological effects of the two new amino-acid hydroxyurea derivatives on colon cancer cell line grown in vitro*” Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with International Participation - HDBMB2008, Osijek, Hrvatska, 17.9. - 20.9. 2008.

7. K. Hock, M. Sedic, **S. Vucinic**, D.Jurismic, P. Gehrig, M. Scott, R. Schlapbach, K. Pavelic and S. Kraljevic Pavelic, “*Using interactomics to unravel molecular pathogenesis of Dupuytren’s disease*”, Interactome Networks: Mapping Macromolecular Interactions in the Cell, Wellcome Trust Genome Campus & CSHL Conference, Hinxton, Velika Britanija, 29.08. - 01.09.2007.

8. E. Gjurcevic, Z. Petrinc, Z. Matasin, **S. Vucinic**, “*Nametnici utvrđeni na Zlatnom Karasu (Carassius auratus L.) držanom u akvariju*” Veterinarska znanost i struka, Cvrtila, Z. (ur.), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 2005. 27-27.

Pozvana predavanja :

- Znanstveno - stručni skup o potočnoj pastrvi i raku, Otočac, Hrvatska, 27.6.2008., Predavanje: “*Veterinomics - Ichtiomics - novi pristupi u tehnologiji*”, **Srdan Vučinić**, dr.vet.med.

Usavršavanja :

1. EMBO practical course: Phosphoproteomics, Odense, Denmark, 28 April - 3 May, 2011.
2. 3rd Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Center for Advanced Academic Studies, Dubrovnik, Croatia, July 5 - 11, 2009.