Praćenje utjecaja valproata na molekularni sastav medija tijekom kulture štakorskog zametka metodom infracrvene spektrometrije

Rašić, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:749728

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Mario Rašić

Praćenje utjecaja valproata na molekularni sastav medija tijekom kulture štakorskog zametka metodom infracrvene spektrometrije

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju za vibracijsku spektroskopiju Zavoda za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Balarin, u okviru znanstvene suradnje s prof. dr. sc. Florianom Bulić-Jakuš sa Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS KRATICA

FIR	daleko infracrveno zračenje, prema engl, *Far infrared*
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, prema engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*
IR	infracrveno zračenje, prema engl. *Infrared radiation*
LWIR	dugovalno infracrveno zračenje, prema engl. *Long wave infrared*
MCT	živa kadmij telurij, prema engl. *Mercury Cadmium Telluride*
MEM	Eaglov esencijalni medij, prema engl. *minimum essential medium Eagle*
MWIR	srednjevalno infracrveno zračenje, prema engl. *Midddle wave infrared*
NIR	blisko infracrveno zračenje, prema engl *Near infrared*
PCA	Analiza principalnih komponenti, prema engl. *Principal component analysis*
SWIR	kratkovalno infracrveno zračenje, prema engl. *Short wave infrared*
VPA	valproična kiselina, prema engl. *Valproic Acid*

SADRŽAJ

1. SAŽETAK
2. SUMMARY
3. UVOD.....1
   3.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom 1
   3.2 Analiza infracrvenih spektara 3
   3.3 Razvoj štakorskog zametka 4
4. HIPOTEZA 6
5. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 6
6. MATERIJALI I METODE 7
   6.1 Priprema uzorka 7
   6.2 Priprema uzorka za FTIR analizu.....7
   6.3 FTIR analiza 8
   6.4 Statistička analiza 8
7. REZULTATI 10
8. RASPRAVA 16
9. ZAKLJUČCI 18
10. ZAHVALE 19
11. POPIS LITERATURE 20
12. ŽIVOTOPIS 22

1. SAŽETAK

MARIO RAŠIĆ

PRAĆENJE UTJECAJA VALPROATA NA MOLEKULARNI SASTAV MEDIJA TIJEKOM KULTURE ŠTAKORSKOG ZAMETKA METODOM INFRACRVENE SPEKTROMETRIJE

Uzorci medija u kojima su rasli štakorski zameci analizirani su FTIR spektroskopijom. Dobiveni spektri su uprosječeni, obrađeni pomoću Studentovog t-testa i multivarijatnom statističkom metodom analize principalne komponente (PCA). Pokazano je da se FTIR spektroskopijom može proučavati biološki materijal odnosno medij u kojem je rastao i razvijao se štakorski zametak. Također je ustvrđeno da se pomoću FTIR spektroskopije može pratiti utjecaj teratogenih supstanci poput valproata koji svojim učinkom mijenja embrij, a samim time i molekularni sastav medija u kojem je zametak rastao. Taj molekularni sastav je moguće pratiti kroz dane razvoja štakorskog zametka. Analiza uprosječenih spektara pokazala je da je utjecaj valproata najveći tijekom neurulacije štakorskog zametka, odnosno da je molekularni sastav medija kontrolne skupine i skupine s valproatom tada najrazličitiji. Pored toga, prikazano je kako je utjecaj valproata na molekularni sastav medija najmanji tijekom četrnaestog dana kulture štakorskog zametka, kada je on na samom kraju svog razvitka prije nego što postane fetus. Rezultati ovog diplomskog ukazuju da je FTIR spektroskopija izuzetno oruđe u proučavanju i praćenu utjecaja valproata na molekularni sastava medija tijekom kulture štakorskog zametka.

Ključne riječi: valproat, FTIR, štakorski zametak, medij

2. SUMMARY

MARIO RAŠIĆ

MONITORING OF VALPROATE EFFECT ON THE MOLECULAR COMPOSITION OF THE MEDIUM DURING RAT EMBRYO CULTURE ASSESSED BY INFRARED SPECTROSCOPY

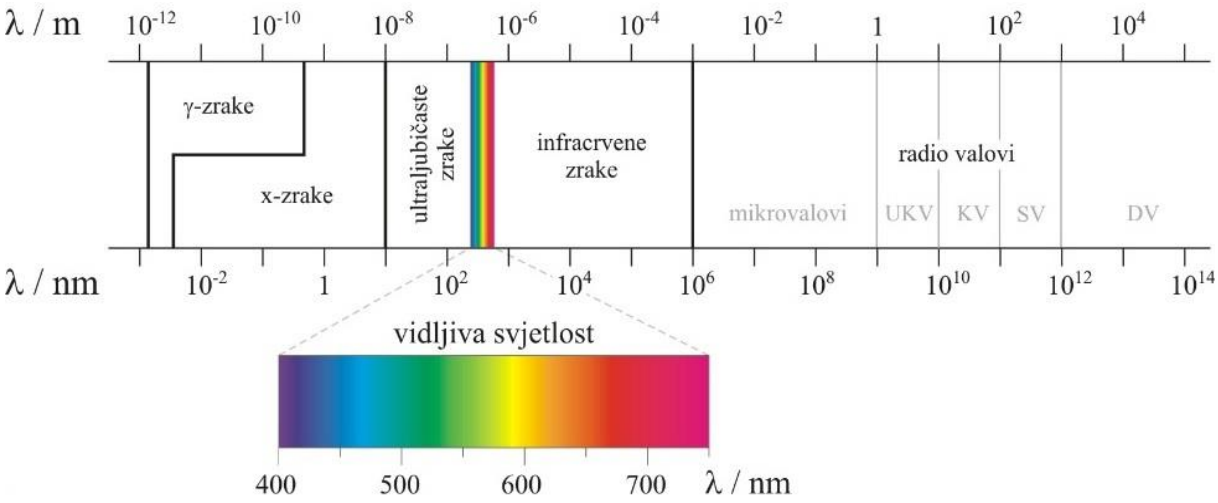
Samples of the rat embryo media in which they grew were analyzed by FTIR spectroscopy. The resulting spectra were averaged and analyzed using Student's t-test and multivariate statistical method, principal component analysis (PCA). It is shown that FTIR spectroscopy can be used to study the biological material such as the medium during rat embryo culture. It is also detected that by using FTIR spectroscopy we can monitor the impact of teratogenic substances such as valproic acid on rat embryos, which by its effect changes the embryo, and therefore the molecular composition of the medium during rat embryo culture. The molecular composition of medium can be followed through the days of the development of rat embryos. The analyzis of averaged spectra revealed that the valproic acid has the highest impact during neurulation of the rat embryo. At that period the molecular composition of the medium in control group and the group treated with valproate is the most different. In addition, it is shown how the impact of the valproate on the molecular composition of the medium is the least significant during the fourteenth day of rat embryo culture when it is in the final stage of its development, before it becomes a fetus. The results of this diploma thesis show that FTIR spectroscopy is an exceptional tool for observing and following the impact of valproate on the molecular composition of the medium during rat embryo culture.

Key words: valproate, FTIR, rat embryo, medium

3. UVOD

3.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Spektroskopija je područje znanosti koje se bavi proučavanjem nastajanja i analize spektara uporabom spektroskopa, spektrometara, spektrografa i spektrofotometara. Interpretacije spektara su vrlo korisne u kemijskim analizama i određivanjima molekularne strukture [1]. Elektromagnetsko zračenje je dvojne prirode, tj. ima i valna i čestična svojstva što znači da se određeni fenomeni mogu objasniti valnom, a drugi čestičnom teorijom svjetlosti. Elektromagnetski spektar obuhvaća različite vrste elektromagnetskih valova, poredanih prema valnim duljinama.



Slika 1. Prikaz elektromagnetskog spektra zračenja. λ označava valnu duljinu, a izdvojeni dio spektra je vidljiva svjetlost valne duljine od 400 do 750 nm.

Infracrveno zračenje (IR) obuhvaća valne duljine od 750 do 1000 μm. Samo područje IR-a možemo podijeliti u ovisnosti o valnim duljinama na [2] :

NIR (*near infrared*): 750 – 1400 nm

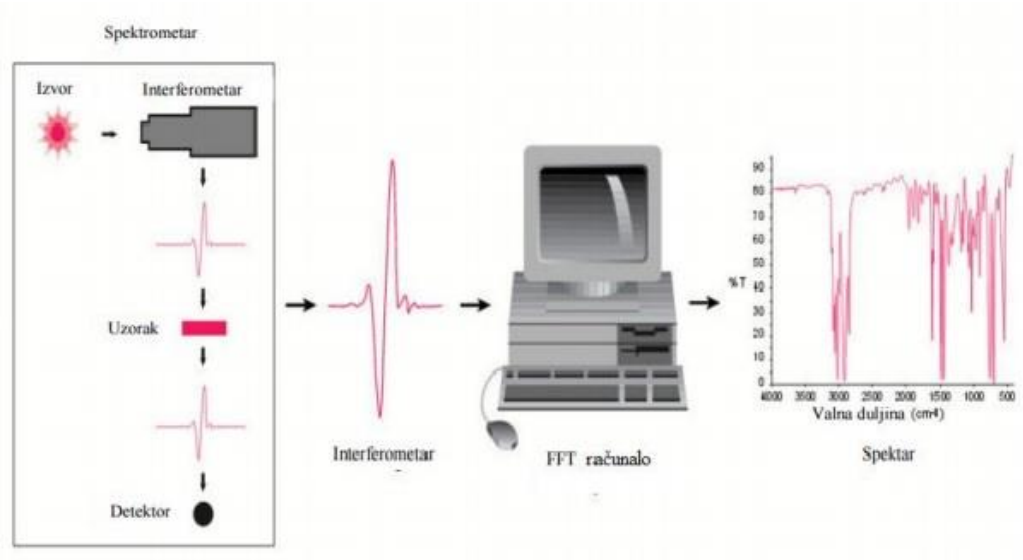
SWIR (*short wave infrared*): 1400 – 3000 nm

MWIR (*middle wave infrared*): 3000 – 8000 nm

LWIR (*long wave infrared*): 8000 – 15000 nm

FIR (*far infrared*): 15000 nm – 1000 μm

IR zračenje mjerimo pomoću spektrometra, a metoda se naziva infracrvena spektroskopija. Osnovna primjena infracrvene spektroskopije je identifikacija nepoznatih supstanci pomoću IR-a. Prvi ju je počeo rabiti Wilbur Kaye, a napredak tehnologije je doveo do razvoja infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) koja je značajno unaprijedila kvalitetu infracrvenog spektra i skratila vrijeme potrebno za snimanje spektara [3]. U FTIR-u se koriste IR zrake koje ili prolaze kroz uzorak ili ih sam uzorak apsorbira na osnovu čega se posljedično određuje struktura molekula tj. molekularni sastav promatranog medija. Glavni problem FTIR-a u prošlosti je bila brzina skeniranja koja je riješena interferometrom s dvije zrake koji se temelji na orginalnoj ideji Michelsona iz 1891. godine po kome danas i nosi ime [4] Michelsenov interferometar. On proizvodi jedinstvenu vrstu signala koji ima sve infracrvene frekvencije zapisane u sebi. Signal se može mjeriti jako brzo, obično u jednoj sekundi. Većina interferometara sadrži djelitelj snopa koji prima ulaznu infracrvenu zraku i razdvaja ju u dvije optičke zrake. Jedna zraka se reflektira od ravnog zrcala koje je fiksirano u mjestu, a druga zraka se reflektira od ravnog zrcala koje je na mehanizmu koji dozvoljava tom zrcalu da se pomiče po kratkoj udaljenosti od razdvajača zraka. Zbog toga što je put jedne zrake koja prolazi stalne duljine, a druge se mijenja kako se zrcalo pomiče, signal koji izlazi iz interferometra je rezultat međudjelovanja te dvije zrake. Rezultirajući signal se zove interferogram i ima jedinstveno svojstvo da svaki podatak zrake koja tvori signal ima informacije o svakoj infracrvenoj frekvenciji koja dolazi iz izvora [5]. Ostali dijelovi koji su potrebni za FTIR spektroskopiju su izvor infracrvenog zračenja, komora za uzorak, detektor te računalo za obradu i prikaz signala [6].



Slika 2. Prikaz načina rada FTIR spektroskopije (prema Stuart-2004)

3.2 Analiza infracrvenih spektara

Velika osjetljivost infracrvene spektroskopije za molekularnu strukturu, kao i molekularne interakcije, omogućava da infracrveni spektar smatramo „molekularnim otiskom prsta“. Analizom infracrvenih spektara brojnih spojeva s uobičajenim grupama atoma, pronađeno je da te grupe apsorbiraju energiju u nekom uskom frekvencijskom području, neovisno od ostalog dijela molekule, a te se frekvencije nazivaju frekvencijama funkcionalnih grupa. Informacije o sastavu uzorka su prisutne u obliku spektralnih vrpci koje proizlaze iz osnovnih vibracija i vibracija različitih funkcionalnih grupa. Iako jednostavne molekule daju jednostavne infracrvene spektre s dobro definiranim apsorpcijskim vrpcama, porastom broja funkcionalnih kemijskih grupa u uzorku raste broj vrpci kao i njihovo preklapanje Tako npr. metilna grupa pokazuje apsorpcije fotona u području frekvencija od 3000-2860 cm^{-1}, 1470-1400 cm^{-1}, 1380-1200 cm^{-1} i 1200-800 cm^{-1} [7].

Tablica 1. Prikaz funkcionalnih grupa

VIBRACIJA	PRIBLIŽAN VALNI BROJ (cm^{-1})
C – H rastezanje	3000
O – H rastezanje	3400
C = O rastezanje	1700
X – H savijanje	1300 - 1500
C = C rastezanje	1600
C ≡ C rastezanje	2200
N – H rastezanje	1500 - 1650

Spektri različitih bioloških supstanci se posebno razlikuju u području otiska prsta. IR spektri bioloških uzoraka obično se snimaju u području od 4000 – 400 cm^{-1} koje se može približno podijeliti u četiri regije i sadrži veliki broj apsorpcijskih vrpci. Prva regija su X – H istezanja (4000 – 2500 cm^{-1}), druga je istezanja trostruke C≡C CH veze (2500 – 2000 cm^{-1}), treća regija je istezanja dvostruke C=C CH veze (2500 – 1500 cm^{-1}) i četvrta je regija otiska prsta (1500 – 600 cm^{-1}) [8]. Postoji nekoliko pravila koje treba uzeti u obzir prilikom same analize infracrvenih spektara :

a) Ako ne postoji nijedna vrpca u području od 1850–1600 cm^{-1} vrlo je vjerojatno da se tu nalazi karbonilna skupina
b) Treba se paziti na preklapanja jer se primjerice aldehidi apsorbiraju blizu 1730 cm^{-1} i između 2900 - 2700 cm^{-1}
c) Bitno se koncentrirati na apsorpcijske maksimume
d) Prisutnost vodikovih veza utječe na frekvenciju vibriranja i samim time mijenja apsorpcijski spektar [6]

FTIR spektroskopija je upravo zbog velike moći detekcije promjena u funkcionalnim skupinama tkivotvornih molekula poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina priznata kao fundamentalna i vrijedna tehnika u biologiji i medicini [9].

3.3 Razvoj štakorskog zametka

Razvoj zametka počinje kada spermij oplodi jajnu stanicu [10]. Novooplođena jajna stanica se počinje mitotski dijeliti i broj stanica se povećava. Kod štakorskog zametka već u trećem danu ima 8-12 stanica, a na polovici trećeg dana nastaje morula .Četvrti dan se razvija blastocista veličine (0.08 x 0.03 mm) koja se počinje implantirati šesti dan sadržavajući trofoblastični konus i unutarnju nakupinu stanicu. Krajem sedmog dana kada je završena implantacija unutarnja nakupina stanica se počinje diferencirati u zametne i izvan zametne dijelove. Sredinom osmog dana nastaje primitivna pruga. Neurulacija koja je jedan od najvažnijih koraka tijekom razvitka embrija počinje sredinom devetog dana. Šesnaesti dan embrij završava svoj razvoj i postaje fetus kojemu rep naraste do 10mm [11]. Bitno je naglasiti razlike u razvoju zametka štakora i čovjeka.

Tablica 2. Razlike u razvoju zametka čovjeka i štakora

Vrsta	Faza razvoja	1 stanica	2 stanice	Morula	Gatrulacija	Neurulacija
Čovjek	Dani razvoja	1	2-3	3	16	19
Štakor	Dani razvoja	1	3	3.5	6	9.5

Na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu razvijen je originalni *in vitro* model postimplantacijskog razvoja zametka sisavaca koji se pokazao prikladnim za istraživanje molekula važnih za odvijanje rasta i diferencijacije u sisavaca kao i embriotoksičnih teratogenih molekula [12]. Iz devet dana starih zametaka Fisher štakora u kojima su se razvili definitivni zametni listići, mikrokirurškom metodom izolira se zametni štit, tj. zametak (embrij) u užem smislu te ekstraembrionalni dijelovi [13]. Zametni štit se sastoji od zametnih listića, koji čine osnovu za razvoj organa [14], a ekstraembrionalni dio čini osnovu za razvoj placente i embrionalnih ovojnica [13].

U ovom diplomskom radu, kao teratogena supstanca kojom su tretirani zameci je valproat tj. valproična kiselina (VPA). To je kemijski spoj koji se u medicini primjenjuje za prevenciju migrenskih glavobolja te liječenju epilepsije i maničnih epizoda povezanih s bipolarnim poremećajem [15]. Za taj lijek postoje dokazi o teratogenom učinku na plod, bazirani na kliničkom iskustvu i znanstvenim istraživanjima te ga se ne preporučuje uzimati tijekom trudnoće.

4. HIPOTEZA

Pretpostavka ovog rada je da se iz infracrvenih spektara medija u kojem je rastao i razvijao se štakorski zametak može odrediti utjecaj valproata kao teratogene supstance koja mijenja metabolizam zametka.

5. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći je cilj rada ispitati mogućnost uporabe FTIR spektroskopije u analizi molekularnog sastava medija u kojem je rastao i razvijao se štakorski zametak.

Specifični ciljevi su:

1. Odrediti najpogodniji način pripreme uzorka za FTIR analizu.

2. Odrediti postoji li razlika na molekularnoj razini u sastavu medija u kojem je uzgajan štakorski zametak u grupi bez VPA i u grupi s VPA.

3. Utvrditi može li se razlika u sastavu medija na molekularnoj razini pratiti kroz dane razvoja štakorskog zametka.

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Priprema uzorka

Ispitivani uzorak je dobiven u okviru suradnje s prof.dr.sc. Florianom Bulić-Jakuš, sa Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koja je mentor mr.sc. Milviji Plazibat, dr. med. u izradi odobrene doktorske disertacije pod naslovom "Utjecaj valproata na postimplantacijski zametak u modelu razvoja štakora *ex vivo*". Za pripremu hranjivog medija za uzgoj zametaka rabio se Eaglov esencijalni medij (MEM, prema engl. *minimum essential medium Eagle*) koji je kemijski definiran medij kupljen je od tvrtke Lonza (Verviers, Belgija). Ne sadrži proteine, već se sastoji od 13 aminokiselina, 8 vitamina, glukoze, fenolnog crvenila (indikator pH), penicilina i streptomicina. Za održavanje konstantnog pH u medij se dodaju Hanksove soli, a ostali dodaci su L-glutamin (#3MB042), penicilin (#3MB149) i streptomicin (#3MB149) koji su kupljeni od tvrtke Lonza (Verviers, Belgija). Tako pripremljeni medij čuva se na +5 ^{O}C.

Valproat (#P4543) je kupljen od tvrtke Sigma (St. Louis, MO, SAD). Koncentracija VPA u mediju iznosi 2 mM. Da bi se dobila ta koncentracija, odvagalo se 3,320 mg VPA te se otopilo u 5 mL MEM-a. Na taj način dobila se otopina MEM-a, s VPA koncentracije 4 mM. Potom se u tu otopinu doda 5 mL štakorskog seruma te se dobije koncentracija VPA u mediju od 2 mM. Kontrolna skupina sadrži 5 mL MEM-a i 5 mL štakorskog seruma.

U pokusu su po četiri zametka stavljeni u plastičnu zdjelicu s mrežicom u sredini ispod koje se stavi medij. Nasađene su tri zdjelice sa zamecima u mediju bez VPA (u daljnjem tekstu kontrolna skupina) i tri sa zamecima u mediju s dodatkom VPA (u daljnjem tekstu VPA skupina). Zameci se kultiviraju tijekom 14 dana u inkubatoru na 30 ^{o}C s 5% CO_2 u zraku [13]. Medij se mijenja trećeg, petog, sedmog, desetog, dvanaestog i četrnaestog dana, te se označava i pohranjuje u epruvete na -80 ^{o}C.

6.2 Priprema uzorka za FTIR analizu

Prije mjerenja uzorak medija se odmrzava na sobnoj temperaturi 50 minuta te se potom mikropipetom otpipetira 10μL uzorka koji se nanese na silicijev prozor optičke kvalitete. Da bi se iz spektara uklonile izrazite apsorpcijske vrpce nastale zbog vibracija i rotacija molekula vode, prozore s uzorcima se 8 minuta suši u vakuumu. Za mjerenje FTIR metodom na

raspolaganju je bilo 10 silicijskih prozora površine od 3-5 cm^2, debljine 500 µm, ujednačenih fizikalno-kemijskih obilježja . Silicijevi prozori s uzorkom se nakon sušenja stavljaju na nosač u odjeljku za uzorke spektrometra.

6.3 FTIR analiza

Za mjerenje je korišten spektrometar marke PerkinElmer GX, koji je spojen na računalo s pripadajućim softverom Spectrum v3.02, tvrtke PerkinElmer, Inc. Uređaj ima mogućnost detekcije transmitiranog snopa IR zračenja MCT detektorom. FTIR metodom sa MCT detektorom rezolucije $4cm^{-1}$ izmjereno je 30 bioloških uzoraka 20 puta što rezultira brojem od 600 različitih spektara. Jedna po jedna, silicijske pločice s osušenim uzorkom, fiksiraju se u ležište nosača koji se smješta u odjeljak za uzorke. MCT detektorom svaki spektar snima se 250 puta, a sam proces snimanja po jednoj pločici s izmjenom pločica na nosaču traje približno 5 minuta. Nakon snimanja uzorka, pripadajući spektar se sprema u elektroničkom obliku na računalo. Kad se snimi svih deset pločica s uzorkom, pristupa se čišćenju silicijskih pločica. Proces čišćenja uključuje ispiranje pločice pod mlazom tekuće destilirane vode i mehaničko čišćenje vatenim štapićem, nakon čega slijedi ispiranje s etanolom radi uklanjanja zaostalih masnoća. Završno ispiranje obavlja se tekućom destiliranom vodom, nakon čega slijedi sušenje u sobnim uvjetima. Navedeni postupak izvodi se u seriji od 10 silicijskih pločica nakon čijeg se sušenja nastavlja s nanošenjem uzorka iz iste epruvete za drugu seriju od 10 snimanja.

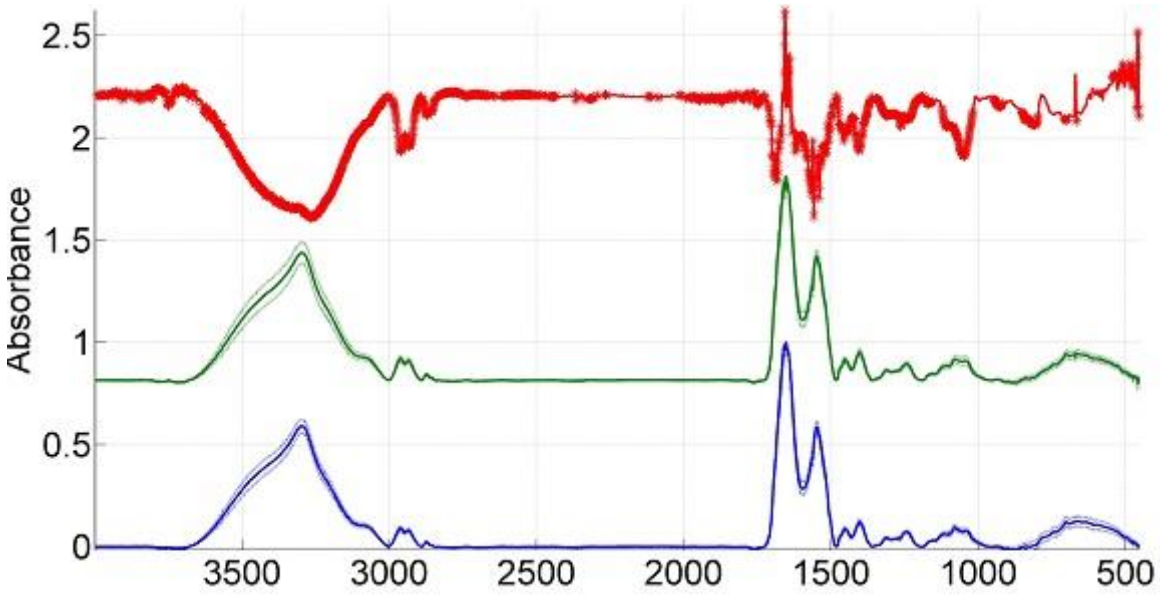
6.4 Statistička analiza

Analiza dobivenih spektara učinjena je programskim paketom MATLAB, proizvođača MathWorks (Natick, MA, SAD) obogaćenim programskim alatom PLS-Toolbox, kupljenim od tvrtke Eigenvector Research, Inc. (Wenatchee, WA, SAD) i programskim alatom Kinetics pomoću kojeg je prvo učinjeno ispravljanje bazne linije (engl. baseline correction) i ostali postupci pretprocesiranja, nakon čega je proveden i Studentov t-test. Studentov t-test je statistički alat za koji su potrebna dva skupa numeričkih varijabli. Namjena Studentovog t-testa jest pokazati postoji li među dvama skupovima podataka značajnije razlike. Ovu statističku analizu uveo je 1908. godine William Sealy Gosset (pseudonim mu je bio „Student“). Za statističku obradu uzima se aritmetička sredina poznatog broja uzoraka te standardna pogreška. Potom se određuje t-vrijednost koja u omjer uzima vrijednost razlike aritmetičkih sredina varijabli i standardne pogreške. Nadalje, karakteristika Studentovog t-testa je uporaba stupnjeva slobode koji se dobivaju oduzimanjem broja standardnih vrijednosti varijabli od

broja varijabli. Osim t-vrijednosti, još jedno karakteristično obilježje Studentovog t-testa je i p-vrijednost koja u slučaju da je manja od 0,05 ($p < 0,05$) ukazuje na signifikantnu razliku u dvjema varijablama. Nakon Studentovog t-testa provedena je multivarijatna metoda analize glavnih komponenti, PCA (engl. principal component analysis) koja je vrlo pogodna za analizu podataka dobivenih vibracijskom spektroskopijom. PCA je standardno oruđe u modernoj obradi podataka u raznim poljima znanosti – od neuroznanosti do računalne grafike iz razloga što je jednostavna, neparametrijska metoda za ekstrakciju relevantnih informacija iz zbunjujućih kompleta podataka koristeći analitička rješenja iz linearne algebre. U PC regresijskoj analizi uspoređivani su kvadrati koeficijenata korelacije (R^2), standardne pogreške modeliranja (RMSEC, prema engl. *rout mean square error of calibration*) i standardne pogreške unakrsnog vrednovanja (RMSECV, prema engl. *rout mean square error of cross validation*). Dobru korelaciju odnosno slaganje između modela i predviđanja pokazuju oni pravci kojima je R^2 što bliže 1, a RMSEC i RMSECV što bliže nuli. Jedan od glavnih primjena PC regresijske analize leži u prevladavanju problema multikolinearnosti koji nastaje kada su dvije ili više nezavisnih varijabli toliko blizu kolinearnosti [16].

7. REZULTATI

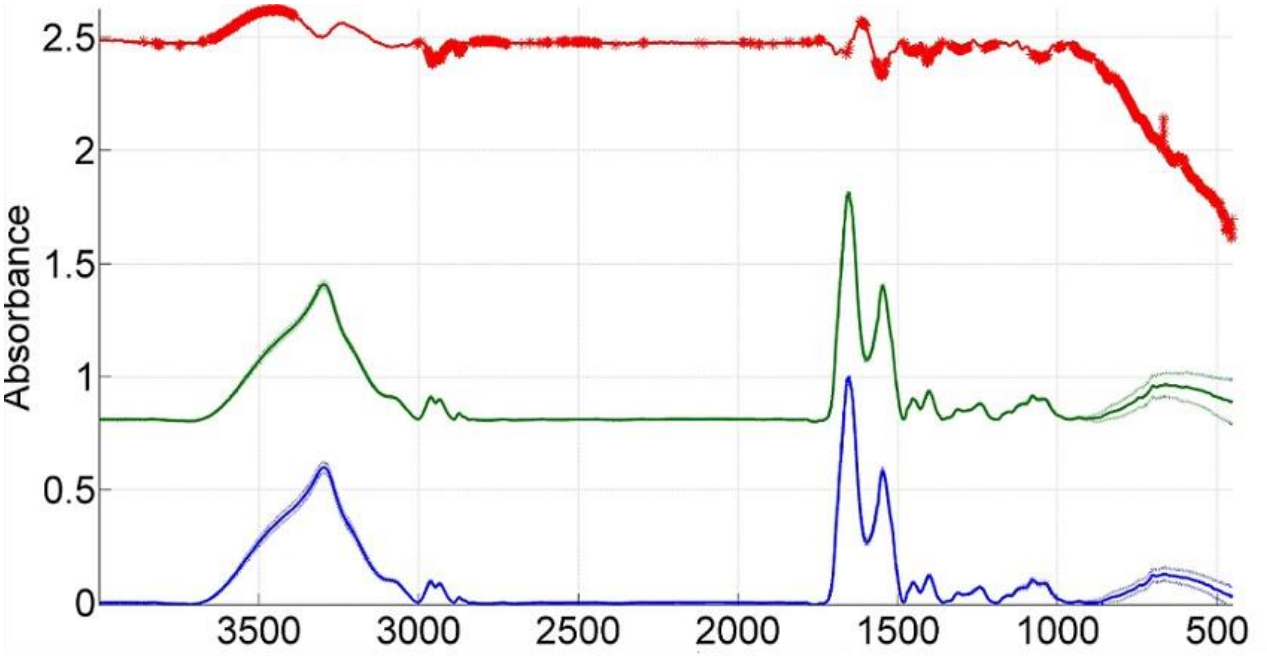
Spektri su mjereni 3., 5., 7., 10., 12. i 14. dan kultiviranja štakorskog zametka. Na početku su obrađeni pomoću Studentovog t-testa. Na slici 3. prikazana je srednja vrijednost spektara trećeg dana kultiviranja štakorskog zametka i njihova razlika. Statistički značajna razlika pojedinih valnih brojeva prikazana je uz pomoć zvjezdica (*) koje se na slici 3. vide kao zadebljanje linije na crvenoj krivulji.



Slika 3. Grafički prikaz Studentovog t-testa za uprosječene apsorpcijske vrpce medija kultiviranih zametaka tretiranih s valproatom i kontrolne skupine trećeg dana kultiviranja. (plavo- uprosječeni spektri kontrole, zeleno- zametci tretirani valproatom, crveno- razlika uprosječenih spektara).

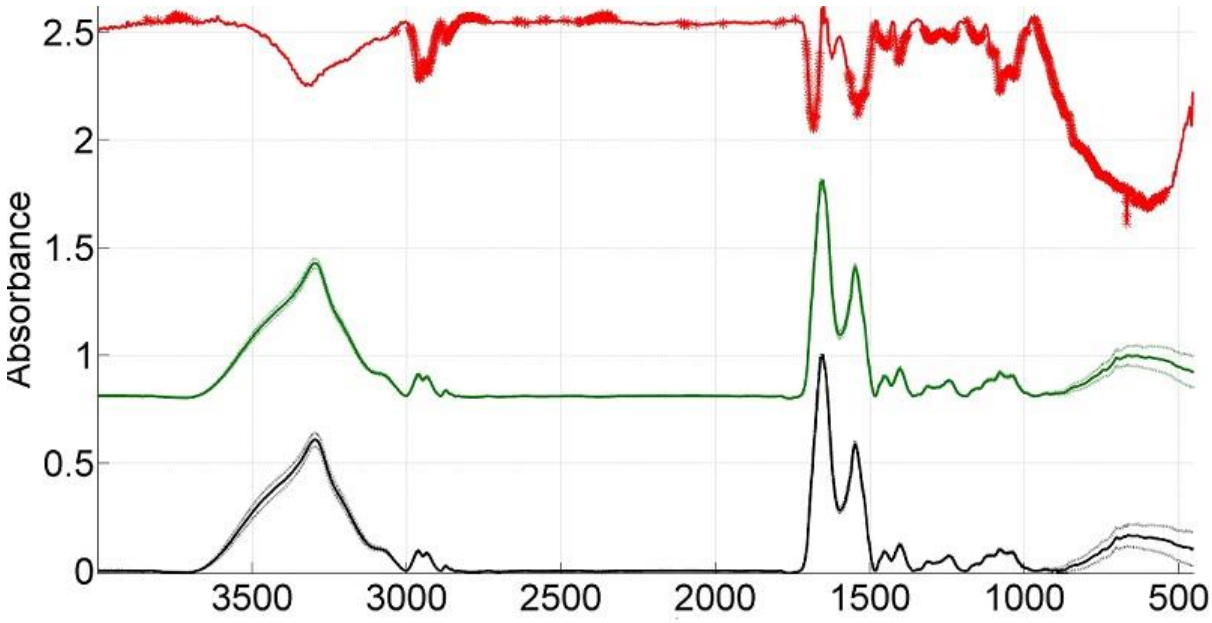
Na spektrima se uočavaju četiri karakteristične skupine vrpci. Prva je u području valnih brojeva između 3000 cm^{-1} i 2800 cm^{-1} koji karakteriziraju vibracije metilne grupe, kojih je u biološkim uzorcima najviše u masnim kiselinama. Područje valnih brojeva između 1700 cm^{-1} i 1350 cm^{-1}, je područje Amid I i Amid II vrpci koje karakteriziraju vibracije karbonilne i metilne grupa te C – N i N – H istezanja peptidne veze, što se povezuje s proteinima. Područje između 1350 cm^{-1} i 1100 cm^{-1}, je tzv. područje miješane zone, jer su tu sadržane vibracije masnih kiselina, nukleinskih kiselina, proteina i polisaharida. Područje između 1150 cm^{-1} i 900 cm^{-1} karakteriziraju vibracije C – O istezanje i C – O – H deformacija, što se povezuje s polisaharidima.

Na slici 4. prikazana je srednja vrijednost spektara petog dana kultiviranja štakorskog zametka i njihova razlika. Također statistički relevantna razlika pojedinih valnih brojeva prikazana je uz pomoć zvjezdica (*).



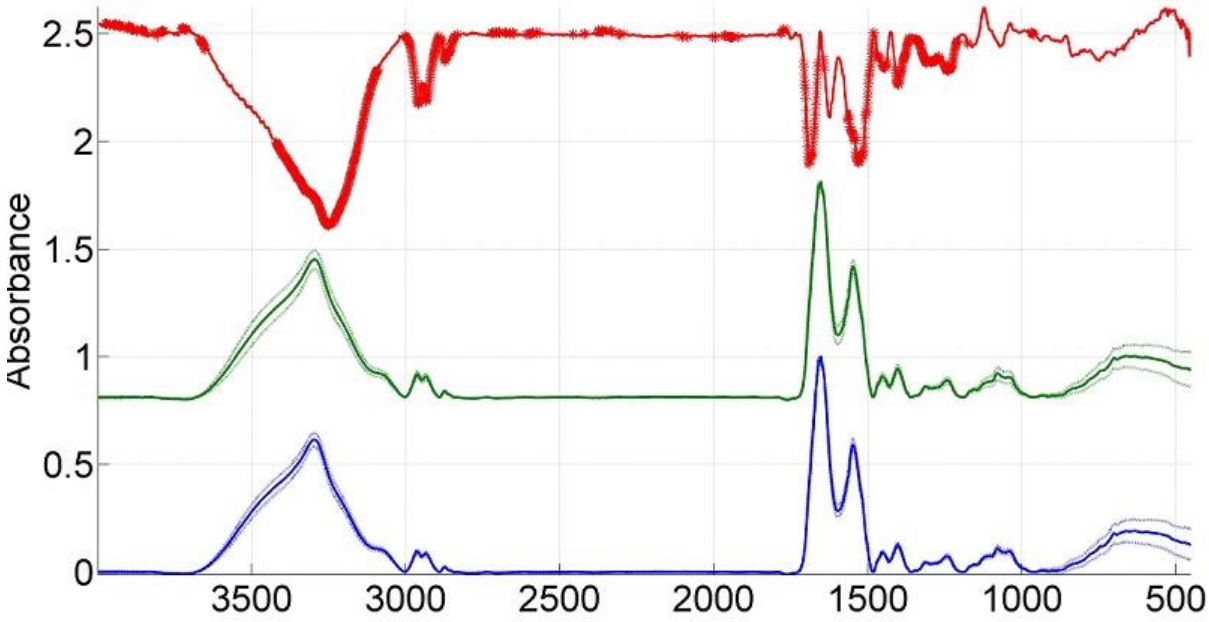
Slika 4. Grafički prikaz Studentovog t-testa za uprosječene apsorpcijske vrpce medija kultiviranih zametaka tretiranih s valproatom i kontrolne skupine petog dana kultiviranja. (plavo- uprosječeni spektri kontrole, zeleno- zametci tretirani valproatom, crveno- razlika uprosječenih spektara).

Rezultati obrade spektara sedmog dana kulture štakorskog zametka prikazani su na slici 5. Statistički relevantna razlika značajna je u području valnih brojeva asigniranih amid I vrpci (1560-1700 cm-1). Oblik razlike spektara pokazuje da je došlo do pomaka položaja amid I vrpce između medija kultiviranih embrija tretiranih s VPA i kontrolne skupine.



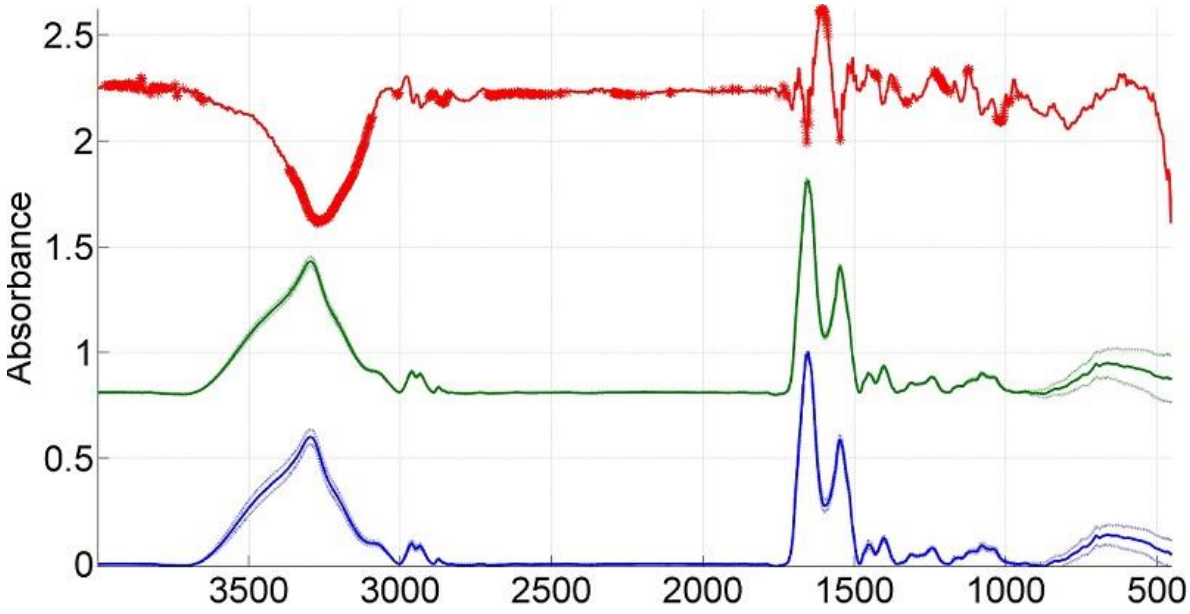
Slika 5. Studentov t-test prikaz uprosječenih infracrvenih spektara sedmog dana kulture. Kontrolne skupine (crno) , a zametak tretiran valproatom (zeleno). Na crvenom spektru čija intenzivnija područja označavaju mjesta većih razlika između grupa, debelo otisnuta područja (**) su područja statističke značajnosti.

Kao što je već naglašeno, Studentov t-test je rađen trećeg, petog, sedmog, desetog, dvanaestog i četrnaestog dana kulture štakorskog zametka, a na slici 6. je prikazan deseti dan kulture. Crvena vrpca na slici 6. je okrenuta negativno u području valnih brojeva između 3000 cm^{-1} i 2800 cm^{-1} koji karakteriziraju vibracije metilne grupe što znači da više metilnih skupina ima u kontrolnoj skupini nego u skupini s VPA.

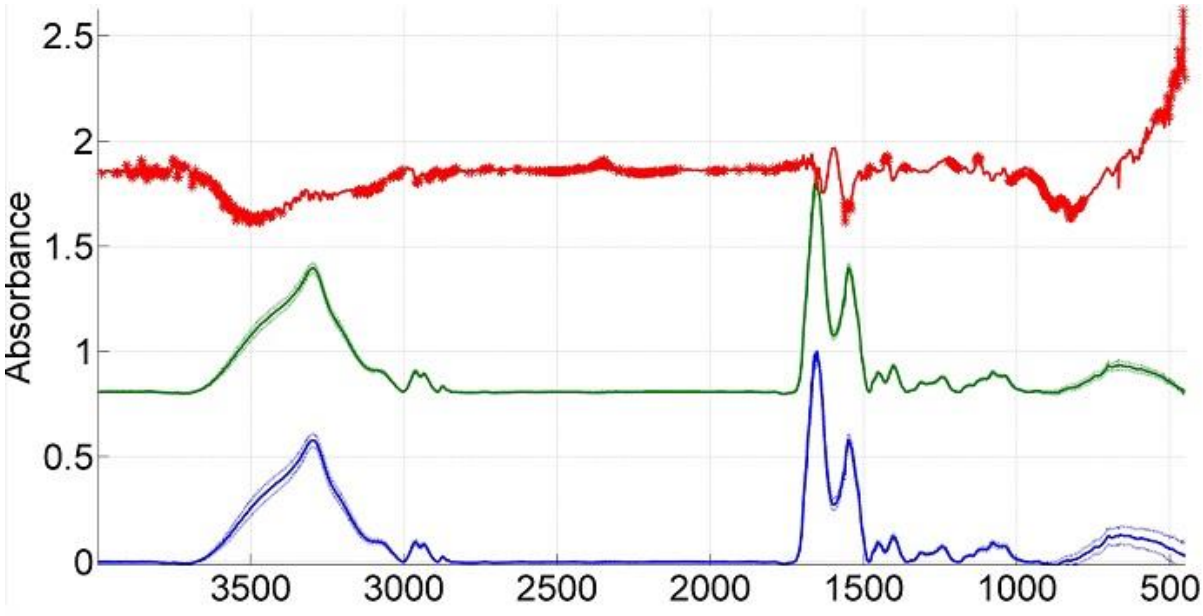


Slika 6. Grafički prikaz Studentovog t-testa za uprosječene apsorpcijske vrpce medija kultiviranih zametaka tretiranih s valproatom i kontrolne skupine desetog dana kultiviranja . (plavo- uprosječeni spektri kontrole, zeleno- zametci tretirani valproatom, crveno- razlika uprosječenih spektara).

Na slici 7. prikazan je dvanaesti dan kulture, dok je na slici 14. prikazan četrnaesti dan kulture.



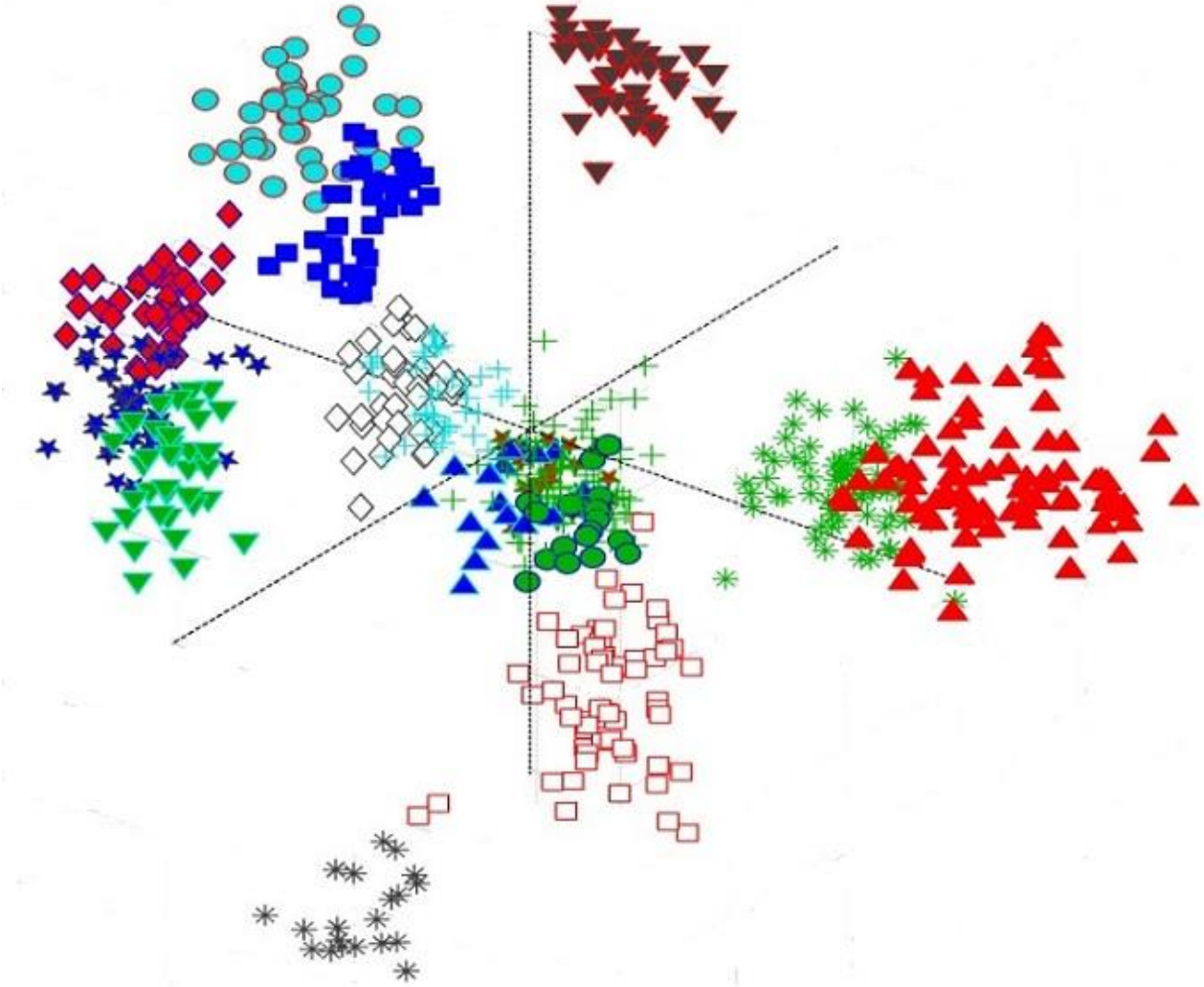
Slika 7. Prikaz uprosječenih vrpci 12. dan kulture štakorskog zametka.



Slika 8. Grafički prikaz Studentovog t-testa za uprosječene apsorpcijske vrpce medija kultiviranih zametaka tretiranih s valproatom i kontrolne skupine četrnaestog dana kultiviranja. (plavo- uprosječeni spektri kontrole, zeleno- zametci tretirani valproatom, crveno- razlika uprosječenih spektara).

Kako se bliži kraju razvoj štakorskog zametka, tako i razlike između kontrolne skupine i skupine tretirane s VPA postaju manje. To se može pripisati tome da VPA ne može utjecati u tolikoj mjeri na zametak koji završava svoj razvoj u odnosu na onaj koji je u fazi neurulacije.

U cilju potvrđivanja rezultata dobivenih Studentovim t-testom, napravljena je i PC analiza spektara iz koje se može zaključiti o postojanju razlike u spektrima medija kontrolne skupine i skupine tretirane s VPA. Analiza multivarijatnom PCA je pokazala grupiranje spektara uzoraka kontrolnih skupina i skupina tretiranih s VPA te njihovo odvajanje od drugih skupina uzoraka prikupljenih različitih dana (3., 5., 7., 10., 12., i 14. dana kulture štakorskog zametka). Razdvajanje točaka koje predstavljaju snimljene spektre je prikazano u PC Scatter plotu na slici 9.



Slika 9. Trodimenzionalni prikaz PCA analize. Svaka grupa određene boje i geometrijskog oblika predstavlja određenu skupinu uzoraka skupljenog pojedinog dana tijekom kulture štakorskog zametka.

8. RASPRAVA

Infracrvena spektroskopija je dovoljno osjetljiva metoda da se njome može pratiti razvitak štakorskog zametka kroz dane razvoja. Također na temelju infracrvene spektroskopije moguće je izgraditi i model za razlikovanje sustava u kojemu se očekuje normalni razvoj zametka, odnosno zametka bez utjecaja teratogena od sustava u kojemu se očekuje poremećeni razvoj (tretiran teratogenom, u ovom slučaju s VPA). Uprosječeni spektri kontrolne skupine i skupine tretirane s VPA, prikazani u rezultatima pokazuju da postoji razlika na molekularnoj razini u mediju u kojem rastu i razvijaju se štakorski zametci. Ta razlika se prati kroz dane razvoja pomoću FTIR-a. Kako bi se ustvrdilo koje se molekule odnosno spojevi razlikuju između kontrolne skupine i skupine tretirane s VPA, analiziramo valne brojeve uprosječenih vrpci. Najveća razlika zamijećena je u dijelu spektra koji odgovara amid I vrpci.

Amidne (peptidne) veze koje povezuju aminokiseline i čine peptidne grupe kao ponavljajuće strukturne jedinice proteina, daju u infracrvenom spektru do devet karakterističnih vrpca nazvanih amid A, amid B te amidi I-VII [6]. FTIR spektroskopija nam omogućuje praćenje utjecaja na temelju razlike u uprosječenim spektrima. Također FTIR spektroskopija zahtijeva vrlo male količine proteina (reda 1 mM) i interpretacija spektra nije opterećena veličinom proteina [17].

Na temelju uprosječenih spektara prikazanih u rezultatima, vidljivo je da se tijekom devetog, desetog, jedanaestog, dvanaestog i trinaestog dana razvoja štakorskog zametka, odnosno trećeg i petog dana kultiviranja (slika 3. i slika 4.), kontrolna skupina od skupine tretirane s VPA razlikuje području valnih brojeva od 3500 cm^{-1} do 3000cm^{-1}. To je područje karakteristično za C – H istezanju i C – H savijanje koje najviše pripisuje alkinima, alkenima i metilnoj skupi koje dosta ima u masnim kiselinama [6]. Također trećeg i petog dana kultiviranja postoje značajne razlike u uprosječenim spektrima i to između 1700cm^{-1} i 1300 cm^{-1}. To je područje Amid I i Amid II vprce koje su karakteristične za proteine. Amid I vrpca (između 1600 i 1700 cm^{-1}) je rezultat istezanja C=O (70-85%) i C-N (10-20%) grupa i direktno je povezana s konformacijom peptidnog skeleta te je najintenzivnija apsorpcijska vrpca proteina. Peptidni skelet sadrži atom amidnog dušika, alfa ugljik atom i atom ugljika karbonilne grupe. Amid II vrpca je rezultat deformacija N-H veze (40-60%) i C-N istezanja (18-40%) i nalazimo je u rasponu valnih brojeva 1510 - 1580 cm^{-1}. Budući da su i C=O i N-H veze uključene u stvaranje vodikovih veza između različitih elemenata sekundarne strukture,

položaji i amid I i amid II vrpci su osjetljivi pokazatelji sekundarne strukture proteina. Tu razliku u području proteina možemo pripisati VPA koji utječe na građu samog zametka. Poznato je da VPA uzrokuje kongenitalne malformacije kod čovjeka. Više od 10% novorođenčadi u ispitanoj grupi je imalo neki oblik malformacije [18].

Također, s obzirom da analizirani period odgovara neurulaciji, za očekivati je da će se upravo najveće razlike u spektrima očitovati u tom razdoblju. Neurulacija je proces koji uključuje preobrazbu neuralne ploče u neuralnu cijev. Proces započinje kada notokord potakne stvaranje centralnog živčanog sustava tako da signalizira ektodermu da formira neuralnu ploču. Kako proces napreduje, neuralna ploča se pretvara u neuralnu cijev. Zatvaranje neuralne cijevi napreduje od sredine prema naprijed i natrag ostavljajući na krajevima privremene otvore. Tijekom daljeg razvitka prednji kraj neuralne cijevi se proširi i preobrazi u mozak, a stražnji ostaje tanak i cilindričan te čini osnovu za kralježničnu moždinu koja zajedno s mozgom čini središnji živčani sustav [19].

Poznato je da VPA ometa zatvaranje neuralne cijevi u miša [20] i čovjeka [21] pa je za očekivati je da će metabolizam, a samim time i molekularni sastav medija zametaka tretiranih s VPA biti različit u odnosu na kontrolnu skupinu.

U prikazanim rezultatim na slici 7. i slici 8. vidi se da uprosječeni spektri kontrole i skupine tretirane s VPA postaju gotovo bez razlike. To možemo tumačiti činjenicom da je zametak završio neurulaciju, odnosno prešao u fetus [11] pa VPA ne može više utjecati u tolikoj mjeri na sami zametak, kao što je utjecao u fazi neurulacije.

Daljna statistička analiza i istraživanja su potrebna da bi se definirala svaka pojedina molekula u mediju, i da bi se otkrio točan mehanizam teratogenog učinka VPA.

9. ZAKLJUČCI

Snimljeni infracrveni spektri analizirani su statističkim metodama Studentovog t-testa i PCA. Pokazano je da se FTIR spektroskopijom može proučavati biološki materijal, a samim time i medij u kojem je rastao i razvijao se štakorski zametak. Utvrđeno je da se poznato toksično djelovanje valproata očituje u promjeni sastava medija, što se može registrirati pomoću FTIR spektoskopije. Također je prikazano da se pomoću FTIR spektroskopije može pratiti utjecaj teratogenih supstanci poput valproata koji svojim učinkom mijenja zametak, a samim time i molekularni sastav medija u kojem je zametak rastao. Taj molekularni sastav medija je moguće pratiti kroz određene dane razvoja štakorskog zametka, na temelju uprosječenih spektara kontrole i skupine tretirane s valproatom. Oni su pokazali da je utjecaj valproata najveći tijekom neurulacije, a najmanji na samom kraju razvoja zametka.

Stoga je zaključeno da je FTIR spektroskopija pogodna metoda za simanje i analizu spektara bioloških materijala, a također i metoda kojom je moguće pratiti utjecaj valproata na štakorske zametke iz molekularnog sastava medija tijekom kulture. To bi omogućilo razvoj in vitro modela za praćenje teratogenog i embriotoksičnog djelovanja različitih supstanci na razvoj štakorskog zametka.

10. ZAHVALE

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Balarin.

Prije svega moram odati priznanje i zahvaliti se svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Balarin čiji savjeti su bili neprocjenjivi pri eksperimentalnoj izradi rada kao i plodonosne diskusije pri interpretaciji dobivenih rezultata.

Asistentu sa Zavoda, Marku Škrabiću, dipl. ing., zahvaljujem što je pomogao svaki put kada bi naišao na probleme pri rukovanju s instrumentom.

Posebno se zahvaljujemo prof. dr. sc. Floriani Bulić-Jakuš koja mi je osigurala uzorke s kojima je ovaj rad izrađen.

11. POPIS LITERATURE

1. A Dictionary of Physics, 4 the edition, Oxford University Press, 2000.
2. Byrnes, James Unexploded Ordnance Detection and Mitigation, Springer, 2009.
3. Barton II. F. E Theories and Principles of Near-Intrared Spectroscopy. *Spectrosc Eur;* 2002;14;12.
4. P. Jacquinot, Rep. Prog. Phys. XXIII, (1961)
5. Griffiths, P., de Hasseth, J.A. Fourier Transform Infrared Spectrometry 2nd ed.. Wiley-Blackwell, 2007.
6. Stuart, Barbara H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Front John Wiley & Sons, 2004.
7. Dubois J, Shaw R. IR spectroscopy's sensitivity to molecular structure and interactions provides a "molecular fingerprint" which is the basis for biomedical applications. Anal. Chem. 2004; 76(19); 360 A–367 A.
8. Weyer LG, Lo SC. Spectra–Structure Correlations in the Near-infrared, in Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 3, Chalmers, J. M. and Griffiths, P. R. Wiley, Chichester, UK, 2002
9. Dritsa V. FT-IR Spectroscopy in Medicine. U: Theophanides T. ur. Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences. InTech; 2012.
10. Marjorie A. , Life Before Birth. 2nd ed., Mosby-Wolfe, 1996.
11. Witschi, E. Development: Rat. In: Growth Including Reproduction and Morphological Development. Altman, P. L. , and D. S. Dittmer, ed. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Washington DC, pp. 304-314, 1996.
12. Bulić-Jakuš F, Katušić Bojanac A, Jurić-Lekić G, Vlahović M, Sinčić N. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay. *WIREs Dev Biol* 2016; 5: 186-208.
13. Bulić-Jakuš F, Vlahović M, Crnek V i sur.. Model kulture *in vitro* zametka štakora u razvojnom stadiju najosjetljivijem na vanjske teratogene faktore. U: Radačić M i sur. ur. Pokusni modeli u biomedicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2000;215-222.
14. Sadler TW, Langmanova medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga; 2004.
15. Feely M, Fortnightly review:drug treatment of epilepsy. *Br Med J;*1999;318;106-109.
16. Dodge Y, The oxford dictionary of statistical terms, OUP; 2003.

.

17. Jabs, Andreas. Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR): Jena Library of Biological Macromolecules. 2000.
18. Robert E. Risques teratogenes de l'epilepsie et des antiepileptiques. Pediatrie;1991; 46;578-583.
19. Lipnick Scott, Jacobson Marcus, Developmental Neurobiology, Springer ISBN 978-0-306-48330-1. 2005.
20. Faiela A, Wernig M, Consales GG i sur. A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. HumMolGenet 2000;9;227-236.
21. Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M.Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol (Praha)*;2007;53;37-49.

12. ŽIVOTOPIS

MARIO RAŠIĆ

Rođen sam u Splitu 24. listopada 1990. godine. Pohađao sam Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Imotskom koju sam završio 2009. Godine 2009. sam upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno sam student šeste godine. Predsjednik sam Studentske sekcije za kirurgiju u sklopu koje sam organizirao tečajeve šivanja i predavanja raznih tema koje su držali liječnici različitih specijalizacija. Također sam obnašao dužnost predsjednika studenata Imotske krajine u Zagrebu. U sklopu nje sam sudjelovao u organizaciji brojnih projekata. Demonstrator sam na Zavodu za fiziku i biofiziku već petu godinu.