

Uloga koštanih morfogenetskih proteina i srodnih molekula u procesu eksperimentalno izazvane fibroze jetre u štakora

Grgurević, Ivica

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:979079>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivica Grgurević

**Uloga koštanih morfogenetskih proteina
i srodnih molekula u procesu
eksperimentalno izazvane fibroze jetre u
štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, Zavoda za anatomiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Slobodan Vukičević

Zahvale

Zahvaljujem svom mentoru Prof. dr. sc. Slobodanu Vukičeviću na pruženoj prilici da učeći od njega i radeći u uigranom znanstvenom timu uživam u ljepoti znanosti. Svojim savjetima, znanjem, velikim entuzijazmom i neizmjernom energijom Prof. Vukičević otkrivao mi je svijet znanosti, pružao primjer znanstvenog promišljanja i djelovanja, te omogućio provedbu ovog istraživanja, na čemu se od srca zahvaljujem.

Iskreno hvala svim djelatnicama i djelatnicima Laboratorija za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu koji su svojim nesebičnim angažmanom, stručnošću i strpljenjem omogućili da ovaj rad uspije. Zahvaljujem se Dipl. ing. Igoru Erjavcu na pomoći kod izvođenja metoda molekularne analize, tehničarkama Đurđi Car i Mirjani Palčić na svekolikoj pomoći kod tretmana eksperimentalnih životinja i izradi histoloških preparata, te imunohistokemijske analize.

Prof.dr. sc. Šimunu Križancu i Mr. sc. Renati Heinzl iskreno hvala na velikom angažmanu i savjetima prilikom obrade i analize patohistoloških uzoraka.

Zahvaljujem Prof. dr.sc. Željku Romiću, Dipl. ing. Adriani Unić i Dr. sc. Dunji Rogić na pomoći pri izvođenju biokemijskih analiza u ovom istraživanju.

Prof. dr. sc. Mladenu Petrovečkom zahvaljujem na savjetima i pomoći prilikom statističke obrade rezultata ovog rada. Hvala mu na strpljenju i lucidnosti.

Ovaj rad u duhovnom smislu proizlazi iz vrijednosti koje su ustrajno i s puno ljubavi zagovarali moji roditelji, na čemu im od srca hvala. Iako je nije doživio, moj otac bio bi posebno ponosan i sretan zbog ove Disertacije i zato je posvećujem njegovoj uspomeni sa sjećanjima punim ljubavi i zahvalnosti.

Neizmjerno hvala mojoj Lovorki na svekolikoj podršci i razumijevanju tijekom izrade ove Disertacije. Hvala na zajedničkim trenucima razmišljanja, diskusije, prijedlozima, vremenu koje je plemenito i bez zadržke posvetila meni i vremenu koje je morala provesti bez mene da bi ga darovala meni. Mojim najdražim dečkima Anti i Tomislavu, hvala što su s tolikom dobrotom, kako to samo djeca znaju, strpljivo izdržali vrijeme koje sam umjesto s njima proveo u izradi ovog istraživanja. Lovorki, Anti i Tomislavu umjesto ovog rada posvetit ću sebe, jer samo uz njih i za njih ovaj rad i moj život dobivaju puni smisao.

POPIS KRATICA

ALD	-od engl. Alcoholic liver disease
BMP	-od engl. Bone morphogenetic protein
BMP1-3Ab	-od engl. Bone morphogenetic protein 1-3 antibody
Col1a1	-od engl. Collagen1 α 1
ECM	-od engl. Extracellular matrix
EMT	-od engl. Epithelial to mesenchymal transdifferentiation
FGF	-od engl. Fibroblast growth factor
Fisher LSD test	-od engl. Fisher Least Significant Difference Test
Fmod	-od engl. fibromodulin
HBV	-Hepatitis B virus
HCV	-Hepatitis C virus
HSC	-od engl. Hepatic stellate cells
HVPG	-od engl. Hepatic venous pressure gradient
IGF	.od engl. Insulin like growth factor
MFB	-od engl. myofibroblast
MMP	-od engl. Matrix metalloproteinases
NAFLD	-od engl. non alcoholic fatty liver disease
NASH	-od engl. Non alcoholic steatohepatitis
PDGF	-od engl. Platelet derived growth factor
PHD	-patohistološka dijagnoza
qRT-PCR	-od engl. Quantitative real time polymerase chain reaction
ROS	od engl. Reactive oxygen species
SNP	-od engl. Single nucleotide polymorphism
TGF β	-od engl. Transforming growth factor β
TIMP	-od engl. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF α	-od engl. Tumor necrosis factor α
α SMA	-od engl. α smooth muscle actin

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	6
1.1. JETRENA FIBROZA.....	6
1.1.1. Definicije.....	6
1.1.2. Epidemiologija kroničnih bolesti jetre.....	6
1.1.3. Patogeneza razvoja fibroze u jetri.....	8
1.1.3.1. Genetski čimbenici rizika za razvoj fibroze.....	8
1.1.3.2. Stanični i molekularni mehanizmi fibrogeneze.....	9
1.1.4. Kliničke značajke jetrene fibroze.....	17
1.1.4.1. Klinička slika i prirodni tijek jetrene fibroze i ciroze.....	17
1.1.4.2. Dijagnostika fibroze i ciroze.....	21
1.1.4.3. Reverzibilnost fibroze i ciroze.....	25
1.1.5. Mogućnosti liječenja jetrene fibroze.....	28
1.2. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI.....	32
1.2.1. Definicija i podjela.....	32
1.2.2. Struktura koštanih morfogogenetskih proteina.....	34
1.2.3. Stanični mehanizmi djelovanja.....	35
1.2.4. Tkivna distribucija i biološka uloga.....	37
1.2.5. Uloga koštanih morfogogenetskih proteina u jetri.....	39
1.2.6. Koštani morfogogenetski protein-1.....	40
2. HIPOTEZA.....	44
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
4. MATERIJAL I METODE.....	45
4.1. Pokusne životinje.....	45
4.2. Protutijela.....	45
4.3. Proteini.....	45
4.4. Eksperimentalni model jetrene fibroze.....	45
4.5. Izolacija jetrenog tkiva.....	46
4.6. Izolacija RNA, sinteza cDNA i kvantitativni PCR (qRT-PCR).....	47

4.7. Histologija.....	47
4.8. Određivanje hidroksiprolina u tkivu jetre.....	49
4.9. Statistička analiza.....	49
4.10. Prikaz redosljeda istraživanja.....	50
5. REZULTATI.....	51
5.1. Analiza razvoja jetrene fibroze u štakora primjenom CCl ₄ i uloge koštanih morfo-genetskih proteina u procesima fibrogeneze i regeneracije jetre	51
5.2. Analiza učinkovitosti primjene BMP-7 i/ili BMP 1-3 protutijela na razvoj jetrene fibroze.....	60
5.3. Analiza učinkovitosti primjene BMP-7 i/ili BMP 1-3 protutijela u procesu regresije jetrene fibroze nakon prestanka djelovanja CCl ₄	69
6. RASPRAVA.....	78
7. ZAKLJUČCI.....	92
8. SAŽETAK.....	94
8. SUMMARY.....	95
9. LITERATURA.....	96
10. ŽIVOTOPIS.....	114

1. UVOD

1.1. JETRENA FIBROZA

1.1.1. Definicije

Fibrogeneza je proces stvaranja i umnažanja veziva u jetri (1). On predstavlja reparatorni odgovor na djelovanje štetne nokse koja oštećuje tkivo jetre. Ovisno o vrsti, jačini i trajanju štetnog djelovanja, kao i o odgovoru domaćina koji je jednim dijelom genetski uvjetovan količina stvorenog veziva u jetri može biti različita. Fenotipska ekspresija bolesti na kliničkom nivou, kao i ona tkivna, bit će dakle rezultanta karakteristika interakcije štetne nokse i domaćinovog odgovora na nju. Fibrogeneza je jedan od najprominentijih patofizioloških procesa u nizu kroničnih difuznih bolesti jetre. U ovu skupinu bolesti ubrajaju se nasljedne bolesti (primjerice Wilsonova bolest, hemokromatoza, deficijencija alfa-1-antitripsina), metaboličke bolesti (masna jetra i nealkoholni steatohepatitis (NASH)), toksične bolesti (alkoholna bolest jetre, toksično djelovanje lijekova, biljnih i industrijskih toksina), infektivne bolesti (virusni hepatitis B i C), autoimune bolesti (autoimuni hepatitis) i kolestatske bolesti (primarna bilijarna ciroza, primarni sklerozirajući kolangitis). Krajnji stadij ovih bolesti jetre je ciroza koju karakterizira velika količina vezivnog tkiva u jetri i smanjenje jetrenih funkcija. Hiroza je kompleksan klinički entitet koji se može definirati na nekoliko razina. Histološki cirozu karakterizira značajna promjena tkivne arhitekture koja je posljedica obilno umnoženog vezivnog tkiva koje zaokružuje pojedine dijelove jetrenog parenhima unutar kojih dolazi do stvaranja regeneratorskih čvorića. Organizacijom i retrakcijom veziva dolazi do skvrčavanja jetre. Zbog smanjenja volumena funkcionalno očuvanog parenhima, tj. smanjenja broja hepatocita dolazi do narušavanja sintetske, metaboličke i ekskretorne funkcije jetre, a zbog opisanih vezivnih promjena dolazi do promjena u hemodinamici hepatoportalne cirkulacije. Kliničke posljedice koje iz toga nastaju su pogubne za cijeli organizam radi čega se u kliničkom smislu o cirozi govori kao o sindromu, a ne samo bolesti jetre.

1.1.2. Epidemiologija kroničnih bolesti jetre

Vodeći uzroci kroničnih bolesti jetre u svijetu su alkoholna bolest jetre, te kronični hepatitis B i C (2). Najteže posljedice ovih bolesti su razvoj ciroze i njenih tipičnih komplikacija, te hepatocelularni karcinom (HCC). Nema preciznih podataka o incidenciji i prevalenciji ciroze jer je ona kod dobrog dijela bolesnika (oko 40%) kod duži vremenski period klinički asimptomatska, pa ostaje neprepoznata (1, 2). Na temelju obdukcijskih studija procjenjena prevalencija ciroze u općoj populaciji kreće se od 4,5-9% (2, 3). U 2001.g. ciroza je bila 6. uzrok smrtnosti (4,4% svih smrti) kod odraslih u razvijenim zemljama, a 9. u slabije razvijenim. Kod bolesnika s dekompenziranom cirozom 5-godišnja smrtnost je oko 50% od čega se barem 70% može izravno pripisati bolesti jetre (4). U ranim 1980-tim godinama najveća smrtnost od ciroze zabilježena je u zemljama Središnje i Južne Amerike, te Južne Europe. Od tada se u ovim zemljama bilježi kontinuirani trend smanjenja smrtnosti od ciroze (do

50%) najviše zbog smanjenja konzumacije alkohola. S druge strane u zemljama srednje i istočne Europe uočen je porast smrtnosti od ciroze koji je dosegnuo vrhunac sredinom 1990-tih, a potom se bilježi postupni pad (5). U zemljama sjeverne Europe i Velikoj Britaniji uočava se postupni porast smrtnosti od ciroze uglavnom kao posljedica povećane konzumacije alkohola. Kronični hepatitis B je globalni zdravstveni problem, jer od njega boluje oko 350 milijuna ljudi, s najvećom prevalencijom u zemljama Jugoistočne Azije, Pacifika i Sub-saharske Afrike. Iako postoji učinkovito cjepivo, na temelju podataka iz 2000.g. svega 116 od 215 zemalja u svijetu provodi kampanju cijepjenja (6). U razvijenim zemljama vodeći uzroci kroničnih jetrenih bolesti uključivo i ciroze su alkohol, hepatitis C i B. Prema podacima iz 1998.g. u Sjedinjenim Američkim Državama od ukupnog broja umrlih od bolesti jetre oko 40% bilo je uzrokovano alkoholom, 15% kroničnim hepatitisom C, a oko 4% kroničnim hepatitisom B (7). Kod ostalih se nije mogla utvrditi etiologija bolesti. Međutim, temeljem novijih istraživanja smatra se da između 34-40% bolesnika s povišenim jetrenim enzimima, bez seroloških ili biokemijskih znakova druge etiologije boluje od nealkoholnog steatohepatitisa (NASH)(8). NASH nastaje na podlozi masne jetre u sklopu metaboličkog sindroma, a osnovni patogenetski poremećaj proizlazi iz pretilosti. Prevalencija masne jetre u općoj populaciju SAD-a procijenjena je na oko 34%, u ostatku svijeta između 9 i 37%, a kod pretilih bolesnika ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) nalazi se u 90% osoba (9). Za razliku od postupnog smanjivanja mortaliteta od alkoholne bolesti, kroničnog B hepatitisa i drugih etiološki nerazjašnjenih bolesti jetre, mortalitet od bolesti jetre povezanih s kroničnim hepatitisom C je u porastu (u SAD-u porast stope za >220% između 1993. i 1998.g.). Iako incidencija bolesti polako opada mortalitet se povećava jer se nalazimo u razdoblju kada je prošlo oko 30 godina od epidemije C hepatitisa u 1970/80-tim godinama, a to je razdoblje potrebno za razvoj kroničnih komplikacija u smislu ciroze i HCC-a. Procjenjuje se da je u 1998.g. za liječenje kroničnih bolest jetre u SAD-u potrošeno oko 1,6 milijardi dolara (10). Transplantacija jetre je najskuplji postupak liječenja bolesnika s cirozom i HCC-om, broj transplantacija je u porastu, a njeni troškovi kreću se preko 100 000 USD po bolesniku godišnje (11).

Zaključno, kronične bolesti jetre koje dovode do fibroze i konačno ciroze jetre i njenih komplikacija predstavljaju veliki javnozdravstveni problem u cijelom svijetu. Kod ovih bolesnika značajno je smanjenja kvaliteta života i radna sposobnost, a zdravstveni sustav opterećen je ogromnim izdacima. Prevencija, te proučavanje etiopatogeneze i iznalaženje novih mogućnosti liječenja ovih bolesti predstavljaju stoga trajan izazov znanstvenoj zajednici, zdravstvenom sustavu i društvu u cjelini.

1.1.3. Patogeneza razvoja fibroze u jetri

1.1.3.1. Genetski čimbenici rizika za razvoj fibroze

U epidemiološkim studijama uočen je vrlo divergentan prirodni tijek bolesti, tj. razvoj fibroze kod niza kroničnih bolesti jetre (12). Najviše iskustava stečeno je na modelu kroničnog virusnog hepatitisa i to kroničnog hepatitisa C. Jasno je uočeno kako kod nekih bolesnika nikada neće doći do razvoja bitnije fibroze, kod drugih će se vrlo brzo (unutar desetak godina) razviti ciroza, dok će kod trećih fibroza napredovati umjerenom brzinom i do ciroze će doći za 30 i više godina (13). Daljnjim analizama uočeno je da u određivanju ovako različitog tijeka bolesti najviše ulogu imaju čimbenici domaćina i okolišni čimbenici. Od čimbenika domaćina pokazalo se da veći rizik od napredovanja fibroze postoji kod muškaraca, bijelaca, osoba starije životne dobi i pretilih, a od okolišnih čimbenika to su uzimanje alkohola, opijata, koinfekcija HBV-om ili HIV-om. Još uvijek postoje dvojbe o udjelu virusnih čimbenika u razvoju fibroze, no čini se da viremija nema značajnu ulogu, a podaci o značaju genotipa virusa su proturiječni (14). I kod drugih etiologija jetrene bolesti uočeno je brže napredovanje fibroze u starijoj dobi i kod muškaraca (osim kod alkoholne bolesti jetre gdje fibroza brže napreduje kod žena). U procesu fibrogeneze sudjeluju brojni medijatori, a različita ekspresija njihovih gena može u bitnoj mjeri odrediti kvalitetu i brzinu napredovanja fibroze (15). Do razlike u ekspresiji pojedinih gena može doći zbog različite kvalitete uzročnog stimulusa ili zbog određenih razlika u genomu. Promjene na genskoj razini mogu obuhvatiti različite mutacije pri čemu se najčešće radi o zamjeni samo jedne nukleotidne baze na određenom lokusu jednog gena (engl. „Single nucleotide polymorphism“-SNP) (16). U nekolicini studija pokušalo se naći vezu između polimorfizama gena za različite citokine sa razvitkom jetrene fibroze, što je prikazano u tabl 1.(17). Iz tablice se vidi da su u procesu jetrene destrukcije i fibrogeneze uključeni različiti čimbenici ovisno o etiologiji što je logično s obzirom da se mehanizmi patogenog djelovanja razlikuju ovisno o uzročnom agensu. SNP inače predstavlja najčešći pojavni oblik mutacija u ljudskom genomu, te je procijenjeno da se javlja na svakih 800-1000 nukleotida, od čega najveći broj u nekodirajućim regijama (5' i 3' netranslantiranim regijama gena, promotorskim regijama, intronima), a sada se zna za oko 10 milijuna SNP (16). Najveća studija koja se bavila istraživanjem utjecaja genskih polimorfizama na razvoj jetrene fibroze obuhvatila je 24 823 SNP kod 1020 bolesnika sa kroničnim hepatitisom C (18). Nađeno je 7 SNP (AQP2, AZIN1, TLR4, TRPM5, rs2290351, rs4290029 i rs17740066) koji su bili značajno povezani s rizikom napredovanja fibroze. Nalaz je potvrđen i u neovisnoj validacijskoj kohorti bolesnika s KHC, te je na temelju toga konstruiran matematički model koji iz haplotipa ovih 7 SNP izračunava genetski rizik za razvoj fibroze.

Tablica 1. Genetski i ne-genetski čimbenici povezani sa progresijom fibroze kod različitih kroničnih bolesti jetre. (prema ref. 17)

Vrsta jetrene lezije	Gen	Puni naziv gena	Ne-genetski čimbenici
Kronični hepatitis C	HFE Angiotenzinogen TGF-β1 TNF-α ApoE MEH MCP-1 MCP-2 Faktor V	Gen hereditarne hemokromatoze Transformirajući faktor rasta Faktor tumorske nekroze Apolipoprotein E Mikrosomna epoksid hidrolaza Monocitni kemotaktični protein Faktor V Leiden	Pijenje alkohola Koinfekcija HIV-om ili HBV-om Dob u vrijeme zaraze Transplantacija jetre Diabetes Rezistencija na terapiju
Alkoholna bolest jetre	IL-10 IL-1β ADH ALDH CYP2E1 TNF-α CTLA-4 TAP2 MnSOD	Interleukin-10 Interleukin-1β Alkoholna dehidrogenaza Citokrom P450, obitelj 2, podobitelj e, polipeptid 1 Antigen tip 4 citotoksičnih T limfocita Transporteru pridružen antigen procesirajući tip 2 Mangan superoksid dismutaza	Pijenje alkohola Epizode alkoholnog hepatitisa
Nealkoholni steatohepatitis (NASH)	HFE Angiotenzinogen TGF-β1		Dob Stupanj pretilosti Diabetes Hipertrigliceridemija
Primarna bilijarna ciroza	IL-1β TNF-α		
Autoimuni hepatitis	HLA-II	Humani leukocitarni antigenski sustav tip II	Autoimuni hepatitis tip II; Rezistencija na terapiju

1.1.3.2. Stanični i molekularni mehanizmi fibrogeneze

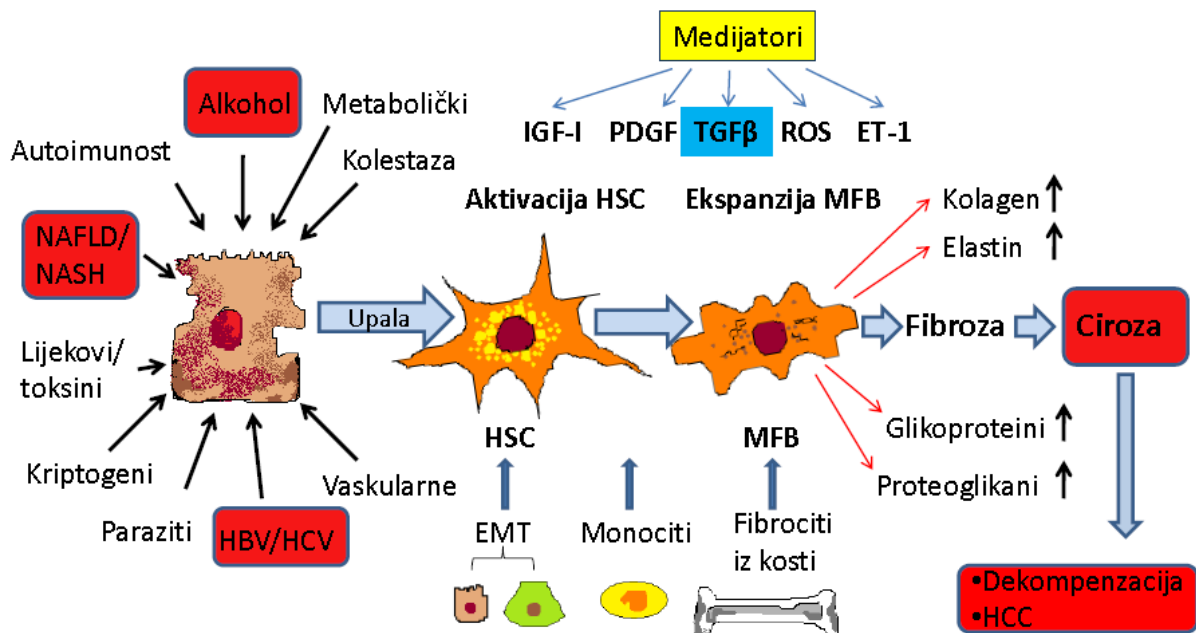
Proces fibrogeneze u jetri obilježen je slijedom patogenetskih zbivanja koja počinju djelovanjem neke štetne nokse, što dovodi do lezije hepatocita i aktivacije niza nespecifičnih upalnih, imunoloških i reparatornih mehanizama u što su uključene brojne stanice kako one u jetri, tako i one ekstrahepatalnog podrijetla koje infiltriraju jetru privučene kemotaksijskim signalima.

Stanice uključene u proces fibrogeneze u jetri

Hepatociti čine 60-80% stanične populacije jetre, dok ostatak od 20-40% čine neparenhimske stanice, među kojima je oko 50% endotelnih stanica, 20% Kupfferovih stanica, 25% limfocita, 5% bilijarnih stanica i manje od 1% hepatičnih stielatnih stanica (19). U populaciji limfocita prevladavaju T stanice (CD4⁺, CD8⁺, NKT) s udjelom oko 63%, dok su manje zastupljene NK stanice (31%) i B-limfociti (6%). Interakcijom između navedenih stanica razvijaju se danas prepoznati obrasci jetrene lezije uz ponešto različit stupanj uključenosti pojedinih celularnih odjeljaka ovisno o etiologiji, tj. uzročniku štetnog djelovanja (20, 21).

Glavne stanice koje stvaraju vezivo u jetri su Hepatične stielatne stanice (HSC), portalni fibroblasti, a tijekom upale u jetru dolaze i stanice iz koštane srži CD34⁺ koje se u tom mikrokruženju diferenciraju u jednu od navedenih vrsta fibroproducirajućih stanica (20, 22-27). Tijekom patološkog zbivanja u jetri pod utjecajem nekih molekula kao što su Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF-β), inzulinu sličan čimbenik rasta II (IGF-II), Epidermalni čimbenik rasta (EGF) i Čimbenik rasta fibroblasta (FBF-2) dolazi i do transdiferencijacije (Epitelno-mezenhimalna tranzicija- EMT) određenog broja hepatocita i stanica bilijarnog epitela koje poprimaju karakteristike fibroproducirajućih stanica (Slika 1) (23, 26). U normalnim okolnostima HSC su takozvanog mirujućeg fenotipa, smještene su u Disseovim prostorima i predstavljaju glavno skladište vitamina A u organizmu (27). U mirnom stanju HSC eksprimiraju markere karakteristične za adipocite (PPAR-γ, SREBP-1c i leptin) dok u aktiviranom stanju eksprimiraju miogene markere (α- glatkomičićni aktin (α-SMA), c-myc i miocitni čimbenik pojačivač-2). Tijekom procesa fibrogeneze HSC migriraju u područje u kojem se događa aktivno oštećenje jetrenog tkiva privučene kemotaksijskim signalima, te se transformiraju u stanice slične miofibroblastima i stječu karakteristike kontraktilnosti, produkcije komponenata ekstracelularnog matriksa (ECM) dominantno kolagena, te na upalni signal i same odgovaraju produkcijom citokina koja pojačava upalu te se na taj način zatvara začarani krug (20-25). Privučene i aktivirane HSC osim produkcije komponenata ECM-a luče niz drugih medijatora značajnih za privlačenje leukocita (ICAM-1, VCAM-1, CXCR3, CCL2,3,5,11, CXCL9 i 10), preživljavanje leukocita (GM-CSF, G-CSF, IFN-tip I, IL-7 i 15), polarizaciju T limfocita (IL-6,12, 15, 17, HGF, TGFB) (27). Aktivirane HSC ponašaju se i kao antigen prezentirajuće stanice (APC) eksprimirajući MHC klase II, Toll-like receptore, CD40, CD80 i CD1b/c, a mogu se ponašati i kao progenitorne CD133⁺ stanice koje se mogu diferencirati u endotelne stanice i hepatocite što sugerira njihovu značajnu ulogu u regeneraciji jetre (27). Jedan od najjačih kemotaksijskih signala za HSC potiče iz Kupfferovih stanica (koje predstavljaju populaciju tkivnih makrofaga i imaju svojstva antigen prezentirajućih stanica) koje luče Čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita (PDGF) i CCL-2 (17, 21, 22, 23, 27). Kupfferove stanice igraju značajnu ulogu u usmjeravanju imunološkog odgovora ovisno o antigenskom motivu uzročnog agensa i njegovoj interakciji sa Toll-like receptorima na/u Kupfferovim stanicama čime se aktivira urođene mehanizme imunosti (21, 22, 28-32). Poželjan je Th1 obrazac

aktivacije koji podrazumijeva snažnu multitopno specifičnu stanično posredovanu imunost, dok je Th2 obrazac karakterističan za humoralnu imunost, parazitske infekcije i alergije, te rezultira jačim razvojem fibroze (pri čemu je jedan od najznačajnijih posrednika IL-13) (21, 31).



Slika 1. Shematski prikaz ključnih etiopatogenetskih mehanizama razvoja jetrene fibroze (prema ref. 22). Kratice: NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease); NASH (non-alcoholic statohepatitis); HSC (hepatic stellate cell); EMT (epitelno-mezenhimalna transdiferencijacija); MFB (miofibroblast); IGF (insulin-like growth factor); PDGF (platelet derived growth factor), ROS (reactive oxygen species); ET-1 (endotelin-1); TGF β (transforming growth factor).

Značajnu ulogu u fibrogenezi igraju i sinusoidalne endotelne stanice (SEC) poglavito u ranoj fazi procesa fibrogeneze što ostvaruju na dva načina (20). Prvo, SEC produciraju velike količine kolagena tip IV, laminina, entactina i perlekana od kojih se formira organizirana bazalna membrana u Disseovim prostorima, te dolazi do kapilarizacije sinusoida sa gubitkom tipičnih fenestracija (33). Drugo, SEC produciraju i velike količine fibronektinove ekstra domene A (EDA)- sastojka koji zajedno s TGF- β i povišenom lokalnom mehaničkom tenzijom čini trijas čimbenika nužnih za diferencijaciju miofibroblasta (34).

Iako se dugo smatralo da je za aktivaciju procesa fibrogeneze nužno prethodno oštećenje hepatocita, sve više spoznaja govori u prilog tome da kod određenih etiologija jetrene bolesti istovremeno i često neovisno jedno o drugom nastupaju i lezija hepatocita i aktivacija HSC, tj. započinje proces fibrogeneze (35, 36). Promatranjem prirodnog tijeka nekih bolesti, primjerice

kroničnog hepatitisa C uočeno je da procesi nekroinflamacije i fibrogeneze ne teku paralelno, tj. da se jetrena fibroza razvija dinamikom neovisnom o jačini upalnog odgovora, te se smatra da je KHC paradigmatična kronična fibroprogresivna bolest (13).

Na molekularnoj razini u aktivaciji i održavanju procesa fibrogeneze uključeni su brojni patofiziološki mehanizmi među kojima su najbolje proučeni nekroza i apoptoza hepatocita, oksidativni stres, lučenje citokina i ishemija. Iako su zahvatne točke djelovanja ovih mehanizama različite, rezultirajući učinci konvergiraju prema HSC čijom aktivacijom dolazi do stvaranja fibroze.

Nekroza i apoptoza hepatocita

Uništavanje hepatocita nastaje direktnim citolitičkim djelovanjem štetne nokse ili uz posredovanje imunološkog sustava što u oba slučaja rezultira nekrozom hepatocita, dok određene nokse dovode do apoptoze hepatocita (23). Nekroza hepatocita uzrokovana citolitičkim djelovanjem evidentna je kod virusnog, toksičnog i autoimunog hepatitisa. Kod virusnih hepatitisa dominira imunoposredovani mehanizam nekroze hepatocita (35, 37). Virus hepatitisa C dovodi do aktivacije Toll-like receptora na B limfocitima i tkivnim makrofagima, koji onda luče citokine kao što su IL-1, 6, 8, TNF- α i potiču ekspresiju molekula MHC klase I na hepatocitima, te aktiviraju NK stanice i CD8⁺ citotoksične T limfocite (38). Potonje stanice prepoznaju HCV u kontekstu MHC molekula klase I na površini hepatocita i iniciraju proces citolize, tj. nekroze hepatocita. NK stanice luče IFN- γ i TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) koji djeluju na ciljane stanice: na hepatocite antivirusno i na HSC inhibirajući njihovu aktivaciju i potičući apoptozu čime bi se trebala zaustaviti produkcija kolagena (39). Istovremeno TGF- β iz HSC-a suprimira NK stanice, pa ovisno o prevladavajućem djelovanju neto učinak u smislu stvaranja fibroze može biti različit (38). Alkohol inhibira NK stanice čime se dijelom može objasniti brža progresija fibroze u alkoholičara s hepatitisom C (38). Osim nekrotične smrti stanice HCV inducira i apoptozu na način da virusni proteini e1, e2 i NS5A potiču ekspresiju FasL u hepatocitima (40, 41). Nastali Fas/FasL (CD95/CD95L) kompleks aktivira caspase čime se pokrene mehanizam apoptoze, degradacije DNA i drugih intracelularnih komponenti što konačno rezultira stvaranjem apoptotičnih tjelešaca. Ova tjelešca bivaju fagocitirana od makrofaga uključivo i HSC (37, 42). U HSC posredovanjem mehanizama prirodne imunosti, tj. putem receptora koji prepoznaju razlikovne uzorke između pojedinih srodnih antigenskih kategorija (engl. Pathogen associated molecular pattern- PAMP), kao što su TLR-4 i TLR-9 prepoznaju se apoptotična tjelešca što je signal za aktivaciju HSC-a. Aktivacija TLR-4 u HSC lipopolisaharidom ili endogenim ligandima (high-mobility group box-1, biglikan, heparan-sulfat) dovodi do smanjene ekspresije BMP and activin membrane bound inhibitor (BAMBI) koji je važan transmembranski supresor TGF- β 1 kao dominantnog fibrogenog citokina u jetri (43, 44). Virus hepatitisa C dovodi i do izravne aktivacije HSC potičući fibrogenezu neovisno o stupnju aktivacije procesa nekroze ili apoptoze hepatocita, o čemu je već bilo riječi. Taj se učinak

ostvaruje na način da NS3-NS5 i core protein u HSC potiču ekspresiju gena za TGF- β 1 i Col1a (kao i inflamatornih citokina IL-8, ICAM-1 i MCP-1) (36), dok se e2 protein vezuje za CD81 receptor na površini HSC i potiče sintezu MMP-2 koji je bitan za početnu degradaciju normalnog ECM-a čine se otvara put penetraciji inflamatornih stanica (45).

Uloga oksidativnog stresa

Djelovanjem alkohola, kolestaze i preopterećenja željezom u jetri dolazi do povećanog stvaranja kisikovih radikala (engl. Reactive oxygen species- ROS) i produkata peroksidacije staničnih lipida (46, 47). Acetaldehid kao jedan od metabolita etanola povećava stvaranje H₂O₂ u hepatocitima i ima izravno fibrogeno djelovanje potičući HSC na sintezu kolagena tip 1 (48). Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) nastaju metabolizmom alkohola putem enzima citokrom P450 2E1 (CYP2E1) (49). U staničnoj kulturi hepatocita s povećanom ekspresijom ovog enzima uočeno je povećano stvaranje H₂O₂ i produkata peroksidacije lipida, što je također dovelo do izravne i pojačane aktivacije HSC i produkcije kolagena tip 1. Značajna uloga CYP2E1 u ovom procesu potvrđena je činjenicom da su navedeni učinci bili prevenirani primjenom antioksidansa i inhibitora CYP2E1 enzima. Nadalje, u HSC postoje redoks senzitivni geni kao što je gen za TGF- β 1 koji se aktivira djelovanjem ROS (primjerice H₂O₂), a ova aktivacija se može blokirati katalazom (50). Sam TGF- β povećava produkciju kisikovih radikala u fibroblastima i ekspresiju gena za kolagen tipa 1 u HSC koji proces je posredovan i pojačan djelovanjem H₂O₂. Nasuprot tome, TNF- α i IFN- γ inhibiraju ekspresiju gena za kolagen tipa 1 (51, 52). Promjena intracelularnog redoks potencijala djeluje i na ekspresiju PDGF-a (53). Međuprodukti metabolizma alkohola onemogućavaju normalan metabolizam masnih kiselina što zajedno s djelovanjem kisikovih radikala dovodi do uništavanja membrane mitohondrija, čime se dodatno narušava energetska metabolizam stanice, a ovi spojevi izravno oštećuju i DNA. Na taj način dolazi do nekroze hepatocita koje fagocitiraju Kupferove stanice nakon čega slijedi pojačanje upalnog odgovora. Iako je aktivacija HSC moguća i izravno, snažniji učinak postiže se prethodnom aktivacijom Kupfferovih stanica, pri čemu je jedan od značajnih posrednika H₂O₂ tj. povećana razina oksidativnog stresa, a ovi učinci se u bitnoj mjeri umanjuju primjenom katalaze kao antioksidansa (54, 55).

Nelakoholna masna bolest jetre (engl. Non-alcoholic fatty liver disease- NAFLD) i nealkoholni steatohepatitis (engl. Non-alcoholic steatohepatitis- NASH) predstavljaju bolesti s rastućom incidencijom, a etiopatogenetski su povezane s pretilosti, tj. razvojem inzulinske rezistencije i metaboličkog sindroma (56). U NAFLD/NASH slobodne masne kiseline koje dolaze u jetru u suvišku induciraju apoptozu hepatocita putem FAS i TRAIL receptora 5, posreduju razvoju oksidativnog stresa, produkciji kisikovih radikala, peroksidaciji lipida, te dovode do disfunkcije mitohondrija (57). Molekule oksidativnog stresa stimuliraju HSC što rezultira njihovim fibroproducirajućim djelovanjem i oslobađanjem niza citokina čime se amplificira upalna reakcija i

zatvara začarani krug (38). Kupfferove stanice također su uključene u ovom procesu tako što amplificiraju upalni odgovor, pri čemu je jedan od najvažnijih medijatora TNF-a koji osim proupalnog ima i aktivirajuće djelovanje na HSC. Leptin, adipocitokin koji je uključen u patogenezu NASH-a pokazuje proinflamatorno (potiče ekspresiju monocitnog kemoatraktivnog proteina- (MCP-1)) i profibrogeno djelovanje, a također potiče neoangiogenezu potičući ekspresiju VEGF i Ang-1 (58).

Utjecaj citokina na fibrogenezu

Razvidno je da značajnu ulogu u moduliranju tkivnog odgovora na štetno zbijanje imaju brojni citokini što uključuje kemokine, interleukine, interferone, faktore rasta, angiogene faktore, vazoaktivne substance, topljive receptore i proteaze. Među citokinima monocitni kemotaktični protein tip 1 (MCP-1) i RANTES stimuliraju, a IL-10 i interferon (IFN)- γ inhibiraju fibrogenezu. Potentne kemotaksijske signale za HSC predstavljaju PDGF, MCP-1 i CXCR3, dok adenzin zaustavlja kemotaksiju (59). Među čimbenicima rasta TGF- β je jedan od ključnih medijatora fibrogeneze u ljudi (25). TGF- β potiče transformaciju HSC u miofibroblaste, stimulira sintezu ECM i inhibira njegovu degradaciju. U novije vrijeme uočeno je da vrlo veliku ulogu u procesu fibrogeneze u jetri ima Connective tissue growth factor (CTGF), koji pojačava djelovanje TGF- β modulirajući intracelularni prijenos signala s njegovog receptora (60). Ovaj scenarij odvija se u hepatocitima, međutim u HSC opisan je i izravni, TGF- β neovisni način djelovanja CTGF-a. Nasuprot tome BAMBI predstavlja pseudoreceptor za TGF- β i vezujući ga onemogućava njegovo normalno djelovanje (61). Molekula TGF- β je član velike TGF- β nadobitelji koju osim njega čine koštani morfogenetski proteini (Bone morphogenetic proteins-BMP) i još neke druge molekule (62). Postoji nekoliko izoformi proteina TGF- β pri čemu najznačajniju ulogu u procesu fibrogeneze u jetri ima TGF- β 1 (63). Među raznim članovima BMP-a u bolesti jetre najbolje je proučena uloga BMP-7 za kojega je utvrđeno da antagonizira učinke TGF- β , smanjujući fibrozu u jetri i potičući regeneraciju hepatocita (64). Suprotno njemu BMP-2 koči diobu hepatocita i time smanjuje regeneraciju jetre nakon hepatektomije (65). Angiogeni faktori kao što su VEGF i FGF imaju ulogu u neoangiogenezi i razvoju fibroze. Putem svojih receptora VEGF stimulira proliferaciju, migraciju i produkciju kolagena u HSC (66). Hepatocitni faktor rasta (HGF) i inzulin slični faktor rasta-1 (IGF-1) umanjuju razvoj fibroze u glodavaca (67, 68). Vazoaktivne tvari također imaju utjecaja na fibrogenezu. Vazodilatatori (NO, relaksin, prostaglandin E2, adrenomedulin, atrijski natriuretski peptid) imaju antifibrozo djelovanje, dok vazokonstriktori (noradrenalin, angiotenzin II i endotelin-1) stimuliraju fibrogenezu (69). Angiotenzin II je jedan od najpotentnijih medijatora u procesu fibrogeneze, koji u tkivima potiče sintezu TGF- β i na taj način ostvaruje svoje fibrogeno djelovanje. Angiotenzinogen je jedina komponenta ovog sustava koja se stvara u zdravoj jetri i to u hepatocitima. U bolesnoj jetri postoji de novo pojačana aktivnost enzima chymaze i ACE-1 koji nastaju u aktiviranim HSC i dovode do nastanka zrelog angiotenzina-II, te povećana ekspresija AT-1 receptora (59). Angiotenzin-II se veže za AT-1 receptore na miofibroblastima potičući ih na lučenje kemotaksijskih signala, sintezu ECM-a i

inhibiciju razgradnje kolagena. Intracelularni učinci uključuju influks kalcija čime se potiče kontraktilnost miofibroblasta, te aktivaciju NADPH oksidaze u HSC čime se potiče stvaranje ROS spojeva koji aktiviraju redoks senzitivne gene kao što su prokolagen-a1, PAI-1, TIMP-1 MCP-1/RANTES. Potičući kontraktilnost miofibroblasta koji se nalaze u sinusoidama i unutar ECM-a angiotenzin-II povećava otpor struju krvi pogoršavajući portalnu hipertenziju, te dovodi do skvrčavanja veziva. Ovi učinci antagoniziraju se djelovanjem na AT2 receptore. Brojne eksperimentalne studije pokazale su da je moguće učinkovito zaustaviti napredovanje fibroze inhibicijom stvaranja angiotenzin II ili blokadom AT-1 receptora (59, 70-73). Ovi rezultati su potvrđeni i u preliminarnim kliničkim studijama kod bolesnika s hepatitisom C i NASH-om (70-71). Ipak, kod bolesnika s cirozom kod kojih je već aktiviran renin-angiotenzinski sustav, primjena ACE inhibitora ili AT1 blokatora može dovesti do hipertenzije i pogoršanja bubrežne funkcije radi čega u tom kliničkom kontekstu vjerojatno neće biti preporučena primjena ovih lijekova (73). Endogeni i egzogeni kanabinoidi također imaju utjecaja na proces fibrogeneze djelujući putem svojih receptora CB1 i CB2 (74). Aktivacija CB1 receptora na HSC stimulira fibrogenezu, dok je CB2 antagonizira.

Uloga ishemije u procesu fibrogeneze

Tijekom procesa fibrogeneze u jetri dolazi do povećanja količine, promjene kvalitativnog sastava vezivnog tkiva, te značajnog remodeliranja tkivne arhitekture. Naime, stvaranjem premoštavajućih vezivnih septuma koji spajaju pojedine portalne prostore međusobno, kao i sa centralnim venama pri čemu dolazi do odlaganja veziva i u Disseove prostore mijenja se i vaskularna arhitektura jetre (23,75, 76). Osim upale i fibrogeneze za vrijeme patološkog zbivanja u jetri aktivira se i proces neoangiogeneze. Neoangiogeneza nastaje u sklopu upalnog djelovanja i oslobađanja vaskularnih faktora rasta (VEGF, Angiopoietin-1 i 2, Tie-2, endoglin) no isto tako značajnu ulogu u tom procesu ima i tkivna ishemija (77). Naročito bitna patofiziološka posljedica nastaje odlaganjem veziva u Disseovim prostorima i procesom kapilarizacije sinusoida, zbog čega se javlja ishemija perisinusoidalnih hepatocita (76). Ishemiji ujedno posreduju i shuntovi nastali neoangiogenezom u fibrozim premoštavajućim porto-portalnim i porto-centralnim septima. Upravo je ishemija bitan stimulus na proliferaciju HSC i fibroblasta čime se pojačava fibrogeneza. Ishemija je dominantni patofiziološki mehanizam nastanka fibroze u jetri kod vaskularnih bolesti jetre, najčešće kongestivne bolesti jetre u sklopu kroničnog zatajivanja srca ili antegradne ishemije kod tromboze vene porte. Hipoksični hepatociti i Kupferove stanice eksprimiraju Hypoxia-inducible factors (HIF), najviše HIF-1a koji povećava stvaranje PDGF-a, PAI-I i FGF-2 što potiče aktivaciju HSC i portalnih fibroblasta mjereno kroz ekspresiju α -SMA i sinteze kolagena tip I (77). Također je uočeno da hipoksični hepatociti oslobađaju VEGF, vazoaktivni peptid Adrenomedulin-1 (ADM-1) i TGF-B1 (78). I aktivirane HSC/MF djeluju kao stanice osjetljive na hipoksiju producirajući VEGF, Ang-1 i njihove receptore VEGFR-2 i Tie-2. Sam VEGF može potaknuti HSC proliferaciju i sintezu ECM. S druge

strane u hipoksija dovodi do smanjene ekspresije HGF-a u HSC, te inhibira ekspresiju c-met u hepatocitima čime se suprimira regenerativna aktivnost jetre tijekom kronične bolesti.

Kvalitativne i kvantitativne značajke ekstracelularnog matriksa u jetri

Proces fibrogeneze karakteriziran je usporednim stvaranjem ECM-a i njegovom razgradnjom pomoću tkivnih metaloproteinaza (engl. Matrix metalloproteinase- MMP) (17, 22, 79). Međutim, u slučaju kroničnog hepatitisa pojačana je i sinteza tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP), no ukoliko se uzročni agens ne eliminira na kraju će ipak prevladati fibrogeni nad antifibrogenim mehanizmima (80, 81). Na koncu će u cirozi količina vezivnog tkiva u jetri biti i 6-10x veća u odnosu na zdravu jetru (17, 22, 23). Tkivne matriks metaloproteinaze igraju značajnu ulogu u procesu fibrogeneze. Na početku patološkog zbivanja HSC luče MMP-2 (gelatinaza A) koja razgrađuje kolagen tip 4, laminin i fibronektin koji su glavni sastojci bazalne membrane, posebno u subendotelnim prostorima. Time se omogućava migracija upalnih stanica i humoralnih medijatora patološkog zbivanja. U ovom procesu razgradnje bazalne membrane sudjeluju i gelatinaza B (MMP-9) i stromelizin (MMP-3). S druge strane MMP-1 je glavna proteaza za razgradnju kolagena tip 1, no njena ekspresija u HSC je značajno manja (82). Tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMP) inhibiraju razgradnju intersticijskog kolagena (80). Interleukin-1B, potentni inflamatorni medijator potiče lučenje TIMP-1, a TIMP-1 pokazuje i antiapoptotično djelovanje na HSC (81). Osim povećane količine, mijenja se i kvalitativni sastav vezivnog tkiva u jetri. U zdravoj jetri glavninu ECM čine kolagen tipa IV, heparan sulfat i laminin, dok su u stanjima jerene fibroze/ciroze najviše zastupljeni fibrilarni kolagen tipa I i III. Mijenja se i kemijska struktura komponenata ECM na način da dolazi do povećane hidrosilacije prolinskih i lizinskih ostataka kolagena, promjene stupnja sulfatacije postraničnih organaka glikozaminoglikana i varijacije ugljikohidratne strukture glikoproteina. (17, 22). Povezivanje i polimerizacija kolagena I, III i V ostvaruje se pomoću tkivne transglutaminaze, lizil oksidaze i ADAMTS2 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-type repeats) (83). Na taj se način vezivo organizira što dovodi do promjene u elastičnosti i čvrstoći jetrenog parenhima. Ovim kvalitativnim promjenama potiče se i mehanizam pozitivne povratne sprege kojim se dodatno pojačava fibrogeneza i to na najmanje 2 poznata načina. Prvo, povećana količina/gustoća ECM-a dovodi do povećane čvrstoće (engl. stiffness) tkiva što predstavlja značajan stimulus za aktivaciju HSC putem integrinskih receptora mehanizmom mehanotransdukcije. (84) i drugo, djelovanjem MMP-a oslobađaju se i faktori rasta koji su vezani unutar ECM-a čime im se omogućava kontakt s ciljnim stanicama u kojima mogu stimulirati rast i fibrogenezu. (85).

1.1.4. Kliničke značajke i prirodni tijek jetrene fibroze

1.1.4.1. Klinička slika i prirodni tijek jetrene fibroze i ciroze

Većina bolesnika s kroničnim difuznim bolestima jetre nema značajnih kliničkih simptoma (1, 86, 87). Od simptoma obično se javlja umor, bolovi pod DRL koji su posljedica rastezanja Gleasonove kapsule, subfebrilne temperature, a ovisno o etiologiji moguća je pojava pruritusa (u autoimunim kolagniopatijama kao što je primarni skerozirajući kolangitis) i ikterusa, ev. ekstrahepatalnih manifestacija (glomerulonefritis ili vaskulitis kod bolesnika s kroničnim hepatitisom B ili C koji su posredovani imunološkim mehanizmima usljed stvaranja cirkulirajućih imunokompleksa antiitijela s antigenima virusa i koji se odlažu u ciljne organe). Postojanje fibroze u jetri ne daje bitno obilježje kliničkoj slici sve dok se ne razvije ciroza kao kompleksan klinički sindrom, a i tada se u kompenziranoj fazi bolest ne mora jasno klinički prezentirati.

U većini kroničnih bolesti jetre vremenski period od početka patogenog djelovanja do nastanka ciroze mjeri se obično desetcima godina, uz određenu varijabilnost. Upravo je poznavanje prirodnog tijeka i čimbenika koji određuju varijabilnost brzine napredovanja jetrene fibroze značajna u određivanju prognoze za pojedinog bolesnika i pravovremenog uvođenja adekvatne terapije. Naime, za neke bolesti jetre postoji učinkovito etiološko liječenje (primjerice antivirusna terapija pegiliranim interferonom i ribavirinom za hepatitis C), no bolesnici, a nekada i liječnici izbjegavaju na vrijeme započeti s liječenjem jer bolest jetre nema značajnu fenotipsku ekspresiju i uglavnom ne interferira s normalnim životom, a s druge strane postoje bojazni od nuspojava terapije. U takvim uvjetima precizno poznavanje stadija jetrene bolesti, tj. fibroze, te očekivane dinamike njenog razvoja kod individualnog bolesnika može imati dalekosežne implikacije quoad vitam i quoad sanationem.

Vjerojano je najbolje proučen prirodni tijek kroničnog hepatitisa C, bolesti od koje u svijetu boluje između 130 i 170 mil. ljudi o čemu su objavljene mnoge velike studije (13, 88). Temeljem rezultata spomenutih studija pokazalo se da je u određivanju prirodnog tijeka, prije svega razvoja fibroze u jetri, odgovorna interakcija između čimbenika domaćina, virusa i okolišnih čimbenika. Muški spol, kasnija dob infekcije, starija životna dob, adipozitet, bijela rasa, te određeni genetski čimbenici domaćina (što je navedeno u odjelku xyz ovog teksta) povezani su s bržim napredovanjem fibroze i većim rizikom od nastanka ciroze (13). Od okolišnih čimbenika rizični su konzumiranje alkohola, pušenje, poglavito kanabisa, HBV i HIV koinfekcija. I dalje postoje kontroverze oko uloge virusnih čimbenika u progresiji fibroze, no prema velikoj švicarskoj studiji čini se da je rizičan genotip 3 virusa HCV (14). Progresija fibroze nije linearna, već ona ima više eksponencijalan oblik ovisno o proteku vremena od trenutka infekcije, te je prosječno vrijeme za razvoj ciroze oko 30 godina što će se dogoditi u oko 1/3 bolesnika. Međutim, ovisno o prisutnosti navedenih drugih čimbenika fibroza može napredovati vrlo sporo, tj. ciroza se neće razviti niti nakon 50 g trajanja infekcije, dok će se kod manjeg broja bolesnika razviti brzo, unutar desetak godina. Jednom kad se razvije ciroza dolazi do

nastupa kliničkih komplikacija u smislu dekompenzacije i nastanka hepatocelularnog karcinoma stopom od 2-4% godišnje (89). Značajna je i spoznaja da stupanj upalne aktivnosti nije u korelaciji sa stadijem fibroze, te je zaključeno kako se kod kroničnog hepatitisa C fibroza razvija barem dijelom neovisno od upalnog zbivanja. Također je uočeno kako vrijednosti ALT-a ne odražavaju niti stanje histološke upalne aktivnosti niti fibroze, te se ne mogu koristiti kao mjerilo za određivanje statusa jetrene bolesti (90). Studije i podaci o razvoju fibroze kod drugih etiologija jetrene bolesti su oskudniji.

Danas najčešća bolest jetre je bolest masne jetre (NAFLD) koja se na zapadnoj hemisferi može naći u 25-30% opće populacije, kod 75% pretilih, 16% osoba s normalnom tjelesnom masom, kod 34-74% osoba s dijabetesom tip 2 i kod gotovo svake pretila osobe s dijabetesom tipa 2 (91). Kod najvećeg broja osoba s masnom jetrom neće doći do aktivacije procesa upale niti fibrogeneze u jetri i oni će imati benigni klinički tijek ukoliko se promatra morbiditet i mortalitet vezan uz jetru, no ukupan morbiditet i mortalitet će ipak biti veći, pretežito na račun kardiovaskularnih bolesti. Zbog metodoloških razloga ne postoje dovoljno uvjerljivi i precizni podaci o tome u kolikog broja bolesnika NAFLD prelazi u NASH, no prema sadašnjim spoznajama to se događa u 1/3 bolesnika, od čega oko 20% razvije cirozu nakon 10 godina trajanja bolesti.

U alkoholnoj bolesti jetre najranija manifestacija je nastanak masne jetre, što se događa u 90% osoba koje piju više od 60g čistog alkohola na dan (92). Ovaj entitet je benigni i nakon prestanka konzumacije alkohola može doći do potpune regresije steatoze u roku od 4-6 tjedana. Ipak, u 5-15% bolesnika može doći do progresije u fibrozu i cirozu usprkos apstinencije. Nastavkom konzumacije alkohola uslijedi aktivacija upalnih mehanizama, te se razvija alkoholni steatohepatitis i fibroza, što je zabilježeno kod 40-60% osoba koje piju 40-80 g alkohola na dan tijekom razdoblja od 25 godina . Progresija u cirozu bilježi se kod 18-50% bolesnika s alkoholnim hepatitisom. Razvoj fibroze u alkoholnoj bolesti jetre povezan je s aktivacijom upalnog zbivanja i ovisi o količini redovito uzimanog alkohola. Tako rizik od ciroze značajno raste kod muškraca koji konzumiraju više od 80 g alkohola na dan i žena koje piju više od 20 g/dan tijekom više do 10 godina. Ipak, i u takvim okolnostima vjerojatnost razvoja ciroze iznosi 6-41%. Međutim, postoje i primjeri osoba koje su konzumirale značajno veće količine alkohola i kod kojih se nije razvila ciroza, što u fokus stavlja moguće metaboličke, tj. nasljedne-genetske čimbenike domaćina.

Najveća i jedina studija koja je usporedno analizirala prirodni tijek bolesti za nekoliko kroničnih bolesti jetre (hepatitis C, HCV-HIV koinfekciju, hepatitis B, hepatitis D, alkoholnu i nealkoholnu masnu bolest jetre, nasljednu hemokromatozu, autoimuni hepatitis i primarnu bilijarnu cirozu) uključila je ukupno 4852 ispitanika (12). Prema njenim rezultatima fibroza najbrže napreduje kod HIV-HCV koinfekcije (50% prevalencija ciroze u dobi od 52 godine), a najsporije kod PBC gdje je 50% prevalencija ciroze nađena tek u osoba starih 81 godinu. Ukoliko se gleda rizik razvoja ciroze u odnosu na trajanje bolesti i tada su najlošiji rezultati nađeni za HCV-HIV koinfekciju gdje 50% oboljelih razvija cirozu nakon 28 godina, kod alkoholne bolesti jetre nakon 35 godina, kroničnog

hepatitisa C nakon 43 godine i 64 godine za kronični hepatitis B. Kod svih etiologija jetrene bolesti uočena je dinamika akceleracije razvoja fibroze sa starenjem. Fibroza se sporije razvijala kod žena za sve etiologije bolesti, osim kod alkoholne bolesti jetre gdje je razvoj fibroze bio brži u odnosu na muškarce.

Nastankom ciroze nastupaju značajne morfološke i funkcionalne promjene u jetri i ekstrahepatalnim tkivima/organima koje će pokrenuti niz patofizioloških zbivanja koje će u jednom trenutku dovesti do sloma kompenzacijskih mehanizama i nastupa klinički uočljivih, najčešće dramatičnih komplikacija. U kliničkom smislu jetrena ciroza je bitno određena s dvije skupine patofizioloških poremećaja (1, 86, 87). Prvo, smanjena je sintetska, metabolička i ekskretorna funkcija jetre koje nastaju kao posljedica manjka funkcionalno aktivnog tkiva jetre, tj. kritičnog smanjenja mase/broja hepatocita. U takvom stanju smanjuje se sinteza proteina u jetri, pri čemu manjak albumina pogoduje nastanku edema, a manjak koagulacijskih faktora povećava sklonost krvarenju. Smanjuje se metabolizam niza lijekova i endogenih intermedijarnih produkata metaboliza, te smanjuje ekskretorna sposobnost što se klinički uočava po porastu vrijednosti bilirubina i pojavom ikterusa. Druga skupina poremećaja patofiziološki je uzrokovana portalnom hipertenzijom koja nastaje zbog povećanog otpora protoku krvi kroz jetru zbog umnažanja i retrakcije vezivnog tkiva. U portalnoj hipertenziji povećava se volumen i tlak krvi u drenažnom sustavu vene porte, što se retrogradno prenosi i na većinu visceralnih organa. Osim mehaničkog faktora, nastanku portalne hipertenzije pogoduju i promjene u cirkulirajućim vazoaktivnim supstancama, koje nastaju zbog smanjenog metaboliziranja jednog dijela njih u jetri koja je postala metabolički insuficijentna. Tako je primjerice smanjena razgradnja endotelina koji djeluju vazokonstriktorno utječući na tonus miofibroblasta koji u vezivnom tkivu jetre okružuju ogranke vene porte. S druge strane povećana je produkcija i smanjena razgradnja NO koji djeluje vazodilatatorno na razini tkivne mikrocirkulacije u splahnihkusu, ali i sustavno, radi čega se stvara hiperkinestka hemodinamika krvotoka u cirozi. Nju dakle karakterizira smanjen vaskularni otpor u sustavnoj, a povećan u portalnoj cirkulaciji. Zbog smanjenog efektivnog cirkulirajućeg volumena krvi, javlja se relativna hipoperfuzija bubrega, a to dovodi do aktivacije renin-angiotenzinskog sustava koji dodatno povećava otpor protoku krvi kroz jetru, a dugoročno može dovesti i do pretjerane vazokonstrikcije u bubregu, čime se stječu uvjeti za nastup jedne od najtežih komplikacija jetrene ciroze, a to je razvoj hepatorenalnog sindroma (93). Zbog povećanog tlaka i volumena krvi u visceralnoj venskoj cirkulaciji, dolazi do formiranja portosustavnih kolaterala kojima krv iz portalnoj sustava nastoji kraćim putem ući u sustavnu cirkulaciju gdje krv cirkulira pod znatno nižim tlakom. Jedna od najdramatičnijih kliničkih komplikacija koje nastaju slijedom navedenih zbivanja je formiranje varikoziteta jednjaka, čija ruptura i krvarenje često predstavljaju fatalan konačni ishod bolesnika s jetrenom cirozom. Zbog porasta otpora protoku krvi na razini jetrenih sinusoida, potencirano smanjenom koncentracijom albumina što rezultira sniženim koloidno osmotskim tlakom krvi, dolazi do stvaranja ascitesa. Kako je narušena ekskretorno-metabolička funkcija jetre i kako postoje obilne portosustavne kolaterale kojima krv iz

probavnog sustava zaobilazi jetru, smanjena je razgradnja-detoksifikacija niza štetnih spojeva kao što su amonijak i neke aminokiseline koje nastaju djelovanjem crijevnih bakterija. Ovi spojevi imaju značajke lažnih neurotransmitera i neurotoksičnosti, te dovode do nastanka jetrene encefalopatije. Nastupom dekompenzacije u obliku jedne ili više navedenih komplikacija ciroze znatno se mijenjaju prognoze za preživljenje bolesnika, koje se u tom trenutku izjednačavaju sa prognozom malignih bolesti (94). Ciroza jetre jest završni stadij niza kroničnih parenhimnih bolesti jetre sa svojim tipičnim histološkim značajkama i kliničkom ekspresijom kako je naprijed opisano. Međutim, davno je već uočeno kako se i unutar toga entiteta mogu raspoznati skupine s različitom prognozom, za što su kliničari nekada upotrebljavali termine „blaga“ ili „teška“ ciroza. Najduže se održao i u praksi se najčešće primjenjuje sustav određivanja stadija ciroze po Child -Turcotte-Pugh-u (Tabl. 2) (95). U tom sustavu uzete su u obzir kliničke manifestacije ciroze i bodovanjem svake od navedenih kategorija dobiva se konačan zbroj bodova koji bolesnika svrstava u stadij A (5-6 bodova), B (7-9 bodova) ili C (10-15 bodova) koji imaju prognostičku vrijednost jer dobro koreliraju s preživljenjem (96). Primjerice, bolesnici u stadiju B ili C (>7 bodova) imaju jednogodišnje preživljenje ispod 90%, što se uzima kao kriterij za stavljanje na transplantacijsku listu. Više od trećina bolesnika u stadiju C će bez transplantacije umrijeti unutar godinu dana. S razvojem novih lijekova (primjerice za virusni hepatitis B i C) i na temelju praćenja bolesnika kod kojih je postignuta eradikacija virusa uočeno je da čak i kod bolesnika s cirozom postoji mogućnost značajne modifikacije prirodnog tijeka bolesti i određene regresije fibroze i patofizioloških posljedica ciroze, što je ipak bilo moguće samo kod „početnih“ stadija ciroze. Time se potvrđuje opravdanost i potreba razmišljanja o cirozi kao dinamičnom entitetu, a ne stacionarnom i nepromjenjivom stanju, te su potrebne dodatne eksperimentalne i poglavito veće kliničke studije koje bi sveobuhvatno proučavale prirodni tijek bolesti i razvoj tkivnih i ekstrahepatalnih zbivanja kod bolesnika s cirozom.

Tablica 2. Child-Turcotte-Pugh klasifikacija stadija ciroze (prema referenci 95).

Parametar	Broj bodova		
	1	2	3
Ascites	Nema	Umjeren (odgovara na terapiju)	Obilan/Refrakteran
Encefalopatija (stupanj)	Nema	1-2	3-4
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	<35	35-50	>50
Albumin (g/L)	>35	28-35	<28
Protrombinsko vrijeme (%)	>70	70-40	<40
INR	<1,7	1,7-2,3	>2,3

1.1.4.2. Dijagnostika fibroze i ciroze

Stadij fibroze definira se histološki iz nalaza biopsije jetre. Postoji nekoliko bodovnih sustava na temelju kojih se procjenjuje stadij fibroze a razlikuju se ovisno o etiologiji bolesti jetre (97). U osnovi radi se o semikvantitativnim bodovnim sustavima koji boduju fibrozu od 0 ukoliko nema fibroze do 4 ili 6 ovisno o autoru, s tim da najviši stadij odgovara razvijenoj cirozi. Kao primjer navodim histološku klasifikaciju virusnog hepatitisa po Ishaku i sur. (Slika 2)(98) koja se uz METAVIR klasifikaciju (99) najčešće primjenjuje u kliničkoj praksi u ovoj indikaciji. Vidljivo je da su razdvojene dvije zasebne kategorije: stupalj upalne aktivnosti što se označava kao stupanj bolesti (engl. Grade) i zastupljenost, ili bolje rečeno, tkivni uzorak fibroze, što se označava kao stadij bolesti (engl. Stage). Kao što je već spominjano, dugoročna prognoza bolesti određena je prije svega stadijem jetrene fibroze. Stadiji fibroze predstavljaju kategorijske varijable gdje ne postoji kontinuirani prijelaz između pojedinih kategorija u smislu količine umnoženog veziva. Zato treba naglasiti da je na ovakav način procjena fibroze semikvantitativna, no ona nudi i mogućnost opisivanja tkivnog uzorka razvoja fibroze, a on se razlikuje ovisno o etiologiji bolesti (97). Primjerice, u alkoholnom, toksičnom i ishemijskom hepatitisu najranije upalne i fibrozne promjene događaju se u pericentralnoj regiji (zona 3 jetrenog režnja). Kod virusnog hepatitisa i kolestatskih bolesti, najranije promjene događaju se u portalnim prostorima, s tendencijom stvaranja fibrozni septuma između pojedinih portalnih prostora i porto-centralnih premioštenja. Zahvaćenost jetre ovim promjenama može biti različita, tj. može doći do pojave porto-portalnih vezivnih septuma u samno manjem broju jetrenih režnja ili se takav tkivni uzorak vidi difuzno. Također unutar istog histološkog stadija moguće je da će količina odloženog veziva biti različita, što dovodi do različite prognoze između dvaju bolesnika. U cirozi moguće je raspon histološke slike od postojanje relativno tankih septuma i regenerativnih makronodula, do vrlo debelih vezivnih septuma koji okružuju male regenerativne čvoriće hepatocita. Iz ovih razloga, upotrebom samo navedenih histoloških klasifikacija ne može se dobiti posve precizna slika o stanju bolesti. Stoga je moguće upotrijebiti alternativne histološke tehnike kojima se količina veziva kvantificira na kontinuiranoj skali, na način da se posebnim bojama oboji samo kolagen (primjerice Sirius Red) i potom gleda relativni postotak obojenog tkiva u odnosu na cijeli preparat. Ovim načinom ne definira se tkivni uzorak razvoja fibroze, već količina vezivnog tkiva, te iako stadij i količina fibroze pokazuju dobru korelaciju, ona nije linearna. Primjerice odgovarajuće morfometrijske vrijednosti količine veziva za stadije fibroze 0, 4 i 6 iznose redom 1,9%, 13,7% i 27,8% (100). Dakle, iako je razlika u količini fibroze između stadija 0 i 4 samo 12% radi se o značajno različitom stadiju bolesti jer kod stadija 4 postoje formirana premoštavajuća septa između portalnih prostora i centralnih vena što ukazuje na nepovoljnu prognozu. Uzevši u obzir sve navedeno vjerojatno bi bilo najispravnije kombinirati obje histološke metode za dobivanje što potpunije slike o stanju bolesti na tkivnoj razini.

STUPANJ AKTIVNOSTI

A. Periportalne i periseptalne piecemeal nekroze (interface hepatitis)

Odsutne.....	0
Oskudne (fokalne, neki portalni prostori (pp)).....	1
Oskudne/srednje (fokalne, većina pp).....	2
Srednje obilne (kontinuirane u <50% pp).....	3
Obilne (kontinuirane u >50% pp).....	4

B. Konfluirajuće i premoštavajuće nekroze

Odsutne.....	0
Fokalne konfluirajuće nekroze.....	1
Konfluirajuće nekroze oko nekih centralnih vena.....	2
Konfluirajuće nekroze oko većine centralnih vena.....	3
Mjestimične portocentralne premoštavajuće nekroze.....	4
Multiple premoštavajuće nekroze.....	5
Multilobularne nekroze.....	6

C. Fokalne nekroze, apoptoza, žarišna upala

Odsutne.....	0
Jedno žarište/vidno polje malog povećanja.....	1
2-4 žarišta.....	2
5-10 žarišta.....	3
Više od 10 žarišta.....	4

D. Portalna upala

Odsutna.....	0
Oskudna.....	1
Umjerena.....	2
Umjerena/obilna u svim pp.....	3
Obilna u svim pp.....	4

Maksimum bodova.....18

STADIJ

Bez fibroze.....	0
Fibroza nekih pp.....	1
Fibroza većine pp.....	2
Fibroza većine pp s mjestimičnim portoportalnim vezivnim septima.....	3
Fibroza pp s obilnim portoportalnim i portocentralnim vezivnim septima.....	4
Obilna vezivna septa s mjestimičnim regenerativnim čvorićima (nekompletna ciroza).....	5
Ciroza (vjerojatna ili sigurna).....	6

Maksimum bodova.....6

pp=portalni prostor

Slika 2. Patohistološki sustav za procjenu stupnja aktivnosti i stadija fibroze po Ishaku i sur. (prema ref. 98)

Iako se još uvijek smatra zlatnim standardom za procjenu fibroze, biopsija ima određena ograničenja (101). Radi se o invazivnoj metodi kod koje postoji određeni, doduše mali, rizik komplikacija kao što su krvarenja i infekcija, a u vrlo rijetkim slučajevima čak i mogućnost smrtnog ishoda (oko 1/10 000). Nadalje, distribucija fibroze nije jednaka u svim dijelovima jetre, što je izraženije kod nekih bolesti primjerice PBC. U kontekstu virusnog hepatitisa u čak 33% slučajeva nađena je razlika u stadiju između uzoraka dobivenih iz lijevog i desnog režnja jetre istog bolesnika, s tim da je ipak ona bila mala, tj. tek kod 2,4% je iznosila više od 1 histološkog stadija (102). U ovom kontekstu treba reći da dobiveni cilindar jetre predstavlja tek 1/50 000 volumena jetre. Dodatni problem proizlazi iz kvalitete biopsijskog uzorka, tj. dobivenog cilindra parenhima jetre. Načelno, što je urorak veći to je reprezentativniji i manja je vjerojatnost da dobiveni stadij ne odgovara stvarnom stadiju jetrene fibroze. Konačno, postoji problem interpretacije PHD nalaza, a i on je u određenoj mjeri ovisan o dimenzijama cilindra jetre. Prema mišljenju većine autora danas se smatra da je u kontekstu kroničnog virusnog hepatitisa za ispravnu interpretaciju potreban cilindar dužine 20-25 mm s najmanje 11 kompletnih portalnih prostora u uzorku (103). Problem s biopsijom postoji i kod praćenja bolesnika, jer dok većina pristane na inicijalnu biopsiju radi utvrđivanja stadija bolesti, vrlo mali broj bolesnika sklon je kontrolnoj biopsiji radi praćenja prirodnog tijeka bolesti ili radi praćenja učinka terapije.

Zbog svih ovih razloga kontinuirano se istražuju nove, neinvazivne metode za procjenu jetrene fibroze (104). One se mogu podijeliti na serološke metode i fizikalne metode temeljene na slikovnim tehnikama. Serološke metode koriste vrijednosti određenih bioloških spojeva komponenata ECM-a prisutnih u krvi koji odražavaju odnos između fibrogeneze i fibrolize u jetri, u kojem slučaju je riječ o direktnim testovima, ili se koriste drugi biokemijski parametri za procjenu fibroze, u kojem slučaju se radi o indirektnim testovima (105). Primjeri direktnih testova su određivanje koncentracije hijaluronske kiseline čije koncentracije pokazuju dobru korelaciju sa histološkim stadijem fibroze, te prokolagen-III-N terminalnog peptida (PIIINP) koji se nalazi u umjerenoj korelaciji sa stadijem fibroze, a na njihovu koncentraciju utječu brojni sustavni čimbenici poput postojanja upale, tumora ili renalne insuficijencije. Indirektni serološki testovi koriste jednostavne biokemijske parametre pojedinačno, u kombinaciji ili konstruiranjem formula dovođenjem ovih varijabli u matematičke odnose. Primjeri jednostavnih testova su AST/ALT omjer (vrijednost >1 sugestivna za cirozu kod kroničnih vir. hepatitisa), broj trombocita ($N < 150 \times 10^9/L$ ima 90% PPV za značajnu fibrozu, dok vrijednosti >150 imaju NPV >90% za cirozu kod kroničnog hep. C), APRI indeks (AST to Platelet Ratio Indeks) s vrijednostima AUROC 0,6-0,88 za fibrozu $\geq F2$. Još složeniji indeks (Fibrotest) dobiven je kombinacijom 5 biomarkera identificiranim prethodnom proteomskom analizom seruma koji uključuje: α_2 -makroglobulin, haptoglobin, apolipoprotein A1, GGT i ukupni bilirubin. Iako je inicijalno konstruiran za bolesnike s kroničnim hepatitisom C (AUROC za $F \geq 2$ od 0,87), pokazalo se

da je pouzdan u procjeni fibroze i kod bolesnika s ALD i NAFLD (AUROC za $F \geq 2$ redom 0,84 i 0,81) (105, 106).

Zadnjih godina veliki interes privukla je primjena neinvazivnih metoda baziranih na slikovnim tehnikama i interpretaciji fizikalnih signala dobivenih analizom jetre. Ovisno o tehnologiji ove metode mogu biti samo slikovne, primjerice ultrazvuk (UZV), kompjuterizirana tomografija (CT), magnetna rezonanca (MR), kombinacija slikovne metode i analize hemodinamike hepatoportalne cirkulacije (UZV s kolor doplerom), međutim najnaprednija i najtočnija tehnologija temelji se na analizi čvrstoće/elasticiteta (engl. Stiffness) jetre. Elastometrijska analiza može se vršiti ultrazvučnim monodimenzionalnim uređajima (engl. Transient elastography (TE); uređaj FibroScan) bez mogućnosti morfološkog prikaza jetre (107) ili uređajima kod kojih je ova tehnologija integrirana u standardnu UZV sondu, te je moguća istovremena morfološka, doplerska i elastometrijska analiza (ARFI tehnologija, od engl. Acoustic Radiation Force Impulse imaging)(108). Najveća iskustva postoje s primjenom FibroScana gdje je prema rezultatima velikih studija AUROC vrijednost za dijagnozu stadija fibroze ≥ 2 po METAVIR klasifikaciji (periportalna fibroza) iznosila 0,79-0,83, a za dijagnozu ciroze (stadij F4 po METAVIR-u) 0,95-0,97 (107). Prema prvim rezultatima elastografija FibroScanom i ARFI tehnologija imaju vrlo sličnu vrijednost u procjeni fibroze, te su AUROC vrijednosti za stadij $\geq F2$ redom 0,84 i 0,82, a za cirozu 0,91 za obje metode (108). Elastografija magnetnom rezonancom dalje vrlo pouzdane rezultate (AUROC za stadij fibroze $\geq F2$ po METAVIR-u 0,999), te omogućava osim elastometrijske procjene kvantitete fibroze i dodatnu morfološku analizu jetre, te procjenu o udjelu masnoće ili opterećenju jetre željezom (109). Međutim, kako se radi o vrlo skupoj metodi koja zahtijeva i duže vrijeme pregleda u odnosu na navedene ultrazvučne elastometrijske metode, malo je vjerojatno da bi se MR šire primjenjivala za procjenu jetrene fibroze.

Kod interpretacije nalaza neinvazivnih seroloških i slikovnih-elastometrijskih metoda potreban je oprez, jer su prijelomne vrijednosti na temelju kojih se određuje zastupljenost fibroze u jetri dobivene usporedbom izmjerenih fizikalnih vrijednosti (koje predstavljaju kontinuirane varijable) sa stadijem fibroze u jetri dobivenim histološkom analizom, koji je kategorijska varijabla (104). Nadalje, svaki od limitirajućih čimbenika koji utječe na valjanost biopsije automatski je mogao utjecati na dobivanje konačnih rezultata vrijednosti neinvazivnih metoda za procjenu fibroze. Primjerice, ukoliko se kao referentna metoda koristila biopsija, a cilindar je bio manji, primjerice oko 1 cm, sa 6 portalnih prostora, moguća je greška uzorkovanja, posljedično nedovoljno točna procjena fibroze u jetri, pa je ta greška ugrađena i u predložene referentne vrijednosti za svaki stadij fibroze dobivene neinvazivnim mjerenjima.

1.1.4.3. Reverzibilnost fibroze i ciroze

Još od antičkih vremena i mita o Prometeju uočena je velika regenerativna sposobnost jetre. Na eksperimentalnom modelu nakon dvotrećinske resekcije štakorske jetre usljedi regeneracija do izvorne veličine hipertrofijom preostalih režnjeva za što je potrebno 5-7 dana. (110) Da bi se to postiglo potrebna je adekvatna kirurška tehnika o kojoj se ostavlja intaktna vaskularizacija i bilijarna drenaža preostalih nereseciranih segmenata. Razvojem medicine, tehnika kirurške resekcije i metoda intenzivnog liječenja pokazalo se da je i u ljudi moguće postići regeneraciju jetre do izvorne veličine nakon resekcije 65-75% volumena jetre, uz uvjet da se radilo o inače zdravoj jetri i da su poštovani principi održivosti funkcioniranja preostalih segmenata (111). Međutim, ukoliko se radi o bolesnoj jetri regenerativna sposobnost je znatno manja i poglavito u slučaju ciroze ekstenzija resekcije je limitirana.

U kroničnim difuznim parenhimnim bolestima jetre glavni problem je stvaranje vezivnog tkiva i razvoj ciroze. U tom kontekstu pojam regeneracije ima šire značenje i u idealnom slučaju podrazumijevao bi s jedne strane nestanak umnoženog veziva, ispravljanje strukturnih promjena u parenhimu jetre i funkcionalnu regeneraciju jetre („restitutio ad integrum“). Jedno od glavnih pitanja koje se nemaće u tom smislu jest može li se primjenom određene terapije postići regresija ili potpuna reverzija fibroze ili čak ciroze. Pri tom treba jasno razgraničiti pojam fibroze od pojma ciroze. Ako je riječ o kroničnoj bolesti jetre s određenom količinom stvorenog vezivnog tkiva, ali bez znakova razvoja ciroze tada se eliminacijom etiološkog čimbenika zaustavlja patološki proces u jetri i može doći do regresije ili čak potpunog nestanka fibroze (112-114). Ranije su takva opažanja zabilježena u kontekstu ALD, hemokromatoze i autoimunog hepatitisa kod kojih se terapijska intervencija sastojala od prestankom pijenja alkohola, odnosno venepunkcija putem kojih se otklanja suvišak željeza iz krvi te imunosupresivne terapije (115-117). U novije vrijeme razvojem učinkovite antivirusne terapije za kronični hepatitis B i C isto je uočeno i u ovim entitetima (112, 118, 119).

Ostaje pitanje postoji li točka do koje je proces fibrogeneze došao i iza koje više nema povratka na normalu („point of no return“). Naime, osim rijetkih iznimki, jednom kad se razvije ciroza, usprkos adekvatnom etiološkom liječenju (primjerice eradikaciji virusa) ne može se postići potpuna reverzibilnost patohistoloških promjena u jetri. Moguća je reverzija fibroze i to u znatnoj mjeri, no određene strukturne abnormalnosti ostaju (112, 113). Najvažnije histološke karakteristike koje obilježavaju cirozu su osim obilnog veziva i njegova specifična arhitektura gdje vezivo okružuje pojedine dijelove jetrenog parenhima unutar kojih dolazi do regeneracije hepatocita, tj. stvaraju se regeneratorni čvorići (23). Radi se najčešće o mikronodulima jer je regenerativna sposobnost hepatocita pod stalnom supresijom dok traje djelovanje štetnog agensa. Osim toga, postoje i područja isključenja parenhima (engl. parenhymal extinction) gdje su gredice hepatocita smještene između debelih vezivnih septuma bez adekvatnog kontakta sa krvotokom usljed čega propadaju, te dolazi do kolabiranja pojedinih dijelova parenhima. Konačno, jedna od najvažnijih karakteristika ciroze jest

neoangiogeneza u vezivnim septumima i pretvaranje sinusoida u kapilare (75, 76). Ukoliko se radi o novoj žili stvorenoj u septumu koji spaja portalni prostor sa centralnom venom ili kapilariziranoj sinusoidi u oba slučaja rezultat je stvaranje arterijsko-venskog shunta čime velike količine krvi projure kroz jetru bez sudjelovanja u fiziološkim procesima interakcije s hepatocitima, te ih ostavljaju ishemičnima. Kako je ranije naglašeno ishemija potiče fibrozu, a fibroza pogoršava ishemiju. Dok se različitim terapijskim intervencijama može u bitnoj mjeri reducirati količina vezivnog tkiva čak i u cirozi, strukturne abnormalnosti, poglavito stvorena neovaskularizacija sa shuntiranjem krvotoka i tkivna arhitektura u pravilu se ne mogu korigirati (112, 113). Glede globalne arhitekture jetre, na eksperimentalnom modelu uočeno je kako se nakon razvoja ciroze i otklanjanja etiološkog čimbenika postiže smanjenje količine veziva, regenerativni mikronoduli postaju makronoduli što odražava prestanak supresivnog učinka patofiziološkog procesa i punu aktivaciju regeneracije hepatocita, no zaostaju vaskularizirani, doduše tanji vezivni septumi posebno porto-centralni (120).

Za daljnje razumijevanje i praktičnu primjenu bile bi potrebne studije u kojima bi se na većem broju bolesnika proučavao prirodni tijek bolesti kod ciroze nakon uspješne terapijske intervencije u smislu otklanjanja uzročnog agensa. U tom smislu nameće se i potreba redefiniranja histoloških klasifikacija jer je u svakoj klasifikaciji krajnji stadij ciroza. Kako je već opetovano spomenuto kategorija ciroze definirana je tkivnim uzorkom, međutim unutar ove kategorije uznapređovalost promjena, počevši od količine veziva (121), debljine septuma, izgleda nodula, vaskularizacije septuma i upalne, celularne komponente nije dodatno subklasificirana, a očito je da postoje podgrupe unutar ovog entiteta koje zbog različitosti histološkog stadija imaju različitu prognozu, različite mogućnosti regresije histoloških promjena, što može imati terapijske implikacije (Slika 3)(23, 94, 112). Drugim riječima, iako je transplantacija definitivna oblika liječenja bolesnika s cirozom, možda kod jednog dijela bolesnika takav vid terapije neće biti potreban. Primjerice, vrijednosti hepatovenskog gradijenta tlaka (HVPG) kao mjerila težine portalne hipertenzije iznad 5 mmHg govore za uznapređovalu fibrozu. Unutar raspona od 5-10 mmHg kod bolesnika sa cirozom ne očekuje se razvoj komplikacija koje slijede iz portalne hipertenzije, te se ciroza u takvom stanju može smatrati kompenziranom. Iznad 10 mm Hg formiraju se varikoziteti jednjaka i ascites, a iznad 12 mmHg postoji značajan rizik od krvarenja iz varikoziteta jednjaka (94). Prema tome, iako bolesnici s HVPG u rasponu od 5 do iznad 12 mmHg svi mogu imati cirozu, očito je njihova bolest u različitim funkcionalnom stadiju i nemaju svi istu prognozu i potrebu za određenom vrstom terapijske intervencije. Vjerojatno bi se uspjehom moglo smatrati kad bi se nekom vrstom terapije kod bolesnika s cirozom i HVPG primjerice 16 mmHg postiglo stabilno smanjenje HVPG unutar raspona 5-10 mmHg uz poboljšanje ostalih parametara funkcije jetre, iako u histološkom smislu ne bi uslijedila potpuna reverzija.

METAVIR	F1-F3		F4		
HVPG (mmHg)		>5	≥10	≥12	≥20
Elasticitet (kPa)	6-7	9-12	13,6	17,6	20-60
Klinički	∅	∅	Formiranje variksa	<ul style="list-style-type: none"> •Krvarenje iz variksa •Ascites •Encefalopatija... 	
Stadij		Kompenzirana ciroza		Dekompenzirana ciroza	
Biologija	Fibrogeneza i angiogeneza	Povezivanje kolagena (cross-linking)	Zadebljana septa Smanjenje veličine nodula	Daljnje smanjenje nodula Acelularna septa Nerazgradiv ožiljak	

Slika 3. Spektar kliničkih i bioloških događanja u jetrenoj fibrozi i cirozi, ovisno o histološkom stadiju (METAVIR klasifikacija), te vrijednostima HVPG (hepatic venous pressure gradient) i elasticiteta (stiffness) jetre. (prema ref. 23 i 112)

1.1.5. Mogućnosti liječenja jetrene fibroze

Liječenje fibroze u ovom trenutku je uglavnom u eksperimentalnoj fazi (122). Međutim, etiološkim liječenjem pojedinih bolesti, kao što je primjena interferona u terapiji kroničnog virusnog hepatitisa B i C, te nukleozi(-ti-)dnih analoga u terapiji kroničnog hepatitisa B, moguće je zaustaviti napredovanje fibroze u stadijima dok se još nije razvila ciroza, a čak u ranoj fazi ciroze dijelom dovesti do smanjenja fibroze ili bitnog odgađanja kliničkih komplikacija (118, 119). Proučavanjem patofiziologije jetrenih bolesti i razvoja fibroze došlo se do bitnih spoznaja koje su ukazale na ciljne medijatore ovog procesa, što je bio prvi korak u pokušaju razvoja antifibrotičnih lijekova. To je posebno interesantno za one jetrene bolesti poput NASH-a ili primarne bilijarne ciroze, kod kojih za sada nema dovoljno učinkovitog etiološkog lijeka, kao i za bolesnike sa virusnim hepatitisom kod kojih nije uspjela eradikacija virusa, kod kojih bi glavni cilj terapije bio zaustaviti razvoj fibroze ili je smanjiti kad je ona već razvijena.

Nekolicina lijekova primjenjena je i u klinici, no većina se nije pokazala dovoljno učinkovitim ili je kod dijela lijekova problem bio neprihvatljivi profil nuspojava. Prema mehanizmu djelovanja ova skupina lijekova može se podijeliti na one sa specifičnim antifibroznim djelovanjem i one s djelovanjem na druge patofiziološke mehanizme čijom aktivacijom dolazi do razvoja fibroze (primjerice oksidativni stres, imunomodulacija) (Tablica 3). Glede učinka AT1 blokatora studije provedene kod bolesnika s cirozom pokazale su dvojbene rezultate: kod jednog dijela bolesnika zabilježena je značajna redukcija HVPG, smanjene serumske konc. hijaluronske kiseline kao markera fibroze (123), dok u drugim studijama nije zabilježen povoljan učinak, ili je čak došlo do razvoja hipotenzije (124). U studiji gdje je AT1 blokator korišten u prevenciji razvoja fibroze kod bolesnika s ALD ($F \geq 2$) postignuto je smanjenje stadija fibroze, postotka fibroze morfometrijskom analizom kao i ekspresije gena za kolagen. (125). Interferon- γ se pokazao učinkovitim kod manje skupine bolesnika s HCV cirozom i doveo do značajnog smanjenja fibroze kod bolesnika s hepatitisom B (126). Učinak aktivatora PPAR- γ (glitazona) ispitan je u nekoliko manjih studija kod bolesnika s NAFLD/NASH, gdje je uglavnom zabilježena tendencija smanjenju biokemijskih parametara jetrene lezije (ALT), no antifibrozni učinak nije konzistentno dokazan, uz mogućnost značajnog porasta tjelesne težine ispitanika (127). Daljna istraživanja ovih isprva obećavajućih lijekova za liječenje NASH-a i fibroze u tom entitetu mogla bi biti dovedena u pitanje nepovoljnim profilom nuspojava tj. zbog povećane kardiovaskularne smrtnosti. Iako se kolhicin pokazao sigurnim lijekom, čijom primjenom je zabilježena regresija biokemijskih markera jetrene lezije i poboljšanje preživljenja, nije se pokazao učinkovitim u redukciji fibroze (128). Silimarin se pokazao učinkovitim u smanjenju peroksidacije lipida i zaustavljanju fibroze kod malih životinja i babuna. Međutim, podaci o učinkovitosti Silimarina u ljudi dvojbeni, te je prema nekim studijama smanjio mortalitet u ALD dok prema drugima nije bilo razlike u odnosu na placebo skupinu (129). Kod non-respondera na anti-HCV terapiju pokazao se učinkovitim u redukciji viremije, no zbog kratkotrajnosti studije nije evaluiran učinak na fibrozu

(130). Polienilfosfatidilkolin je ekstrakt soje koji se sastoji od 95% polinezasićenog fosfatidil kolina (koji je inače sastojak staničnih membrana). Djeluje kao antioksidans sprječavajući peroksidaciju lipida i na eksperimentalnom modelu ima antifibrozo djelovanje, što na žalost nije potvrđeno u humanim studijama (131).

Tablica 3. Lijekovi s mogućim antifibrozim djelovanjem koji se primjenjuju u kliničkoj praksi, ili su ispitivani u kliničkim studijama. HCV- kronični hepatitis C; NASH-nealkoholni steatohepatitis; Etil-alkoholna bolest jetre; PBC-primarna bilijarna ciroza, HSC-hepatične stielatne stanice; (-) bez učinka/nuspojave, (+ do +++) dobar učinak različite jačine/siguran, bez značajnih nuspojava. (prema Ref. 122)

LIJEK	BOLEST	UČINKOVITOST	SIGURNOST	KOMENTAR
Kolhicin	Razno	+/-	++++	Sinteza kolagena
Interferon-γ	HCV	+/-	++	HSC
ARB	Razno	+/-	++	HSC
PPARligandi	NASH	++	++	HSC
Silymarin	Etil	+	+	Antioksidans
Interleukin-10	HCV	++	+/-	Porast viremije!
Polienil-fosfatidilkolin	Etil	-	++++	Antioksidans
Propiltiouracil	Etil	-	++	Antioksidans
S-adenozil metionin	Etil	+	+++	Antioksidans
Anti-TNFα	Etil	++	+	Protuupalni
Ursodeoksikolna kiselina	PBC/Razno	+	++++	Antioksidans /Imunomodulator
Vitamin E	NASH/HCV	-	++++	Antioksidans

Ursodezoksikolna kiselina (UDCA) umanjuje brzinu napredovanja fibroze (ali ne dovodi do nejne regresije) kod primarne bilijarne ciroze posebno ukoliko se počne primjenjivati u ranijim stadijima bolesti, a nema težih nuspojava (132). Interleukin-10 djeluje antiinflamatorno i u studiji gdje je davan bolesnicima s hepatitisom C doveo je do smanjena upalne aktivnosti i stadija fibroze, ali na račun povećanja viralne replikacije, radi čega je njegova vrijednost u kontekstu hepatitisa C upitna (133). Brojni antioksidansi i supstance drugih mehanizama djelovanja (Vit. E, malotilat, propiltiouracil, S-adenozilmetionin, penicilamin) ispitivani su kod ljudi, no nema uvjerljive potvrde za njihovu

djelotvornost. (122) Studije s antiTNF- α u liječenju ALD pokazale su da dolazi do smanjenja upalne aktivnosti, no za sada bez uvjerljivih dokaza i o antifibroznom učinku (134).

Glede antifibroznog djelovanja α -interferona, tj. njegovog pegiliranog oblika provedene su studije kod bolesnika s cirozom nastalom kao posljedica kroničnog hepatitisa kod kojih prethodnom terapijom nije postignuta eradikacija virusa. Ideja je bila da se primjenom terapije održavanja manjom dozom pegiliranog interferona usprkos neuspješnoj eradikaciji virusa pokuša zaustaviti napredovanje fibroze i odgoditi posljedične kliničke komplikacije ili u najboljem slučaju postići regresija fibroze. Na žalost rezultati nisu bili zadovoljavajući. U HALT-C studiji (135) korišten je PegIFN- α 2a 90 μ g 1x tjedno kroz 3,5 godine kod bolesnika s uznapredovalom fibrozom (F3-6 po Ishaku). Bolesnici su podijeljeni u skupine s uznapredovalom fibrozom (F3-4) i cirozom (F5-6). U svakoj skupini bolesnici su randomizirani u terapijsku ili placebo grupu. Kod bolesnika s cirozom nije bilo razlike između terapijskih podskupina u nastupu neke od komplikacija ciroze (smrt, dekompenzacija, HCC, transplantacija), a kod bolesnika s uznapredovalom fibrozom (F3-4) nije bilo razlike između terapijskih podskupina u histolokom napredovanju fibroze (u ovoj skupini fibroza je napredovala za barem 2 stadija kod 28,2% bolesnika na terapiji i 31,9% na placebo; $p=0,46$). U necirotičnoj skupini nakon 3,5 god. nekroinflamatorna aktivnost se doduše smanjila za 1 bod (stupanj) u terapijskoj, a samo 0,03 boda u placebo skupini ($p<0,001$), međutim u prosjeku je došlo do progresije fibroze za 0,38 u prvoj i 0,42 bodova u drugoj skupini. U studiji EPIC³ (136) gdje je korišten PegIFN-2b u dozi održavanja 0,5 μ g/kg 1x tjedno kod bolesnika s cirozom nije bilo značajne razlike u vremenu do nastupa kliničkih komplikacija između terapijske i placebo skupine, no u podskupini bolesnika koji su imali portalnu hipertenziju na početku studije kod onih koji su dobivali terapiju u značajno manjem broju došlo je do razvoja ascitesa ili krvarenja iz varikoziteta jednjaka ($p=0,007$).

S novim spoznajama o procesu fibrogeneze na molekularnoj i staničnoj razini, otvaraju se nove perspektive u istraživanju antifibroznih lijekova (Tablica 4). Na molekularnom nivou istražuju se lijekovi koji inhibiraju put TGF- β kao jednog od ključnih medijatora fibrogeneze u jetri (137). Izravna inhibicija djelovanja TGF- β nije u potpunosti poželjna zbog njegovih imunomodulatornih svojstava, tj. antitumorskih učinaka. Modulacija TGF- β posredovanog djelovanja mogla bi biti učinkovitija ukoliko bi se inhibirali specifični postreceptorski mehanizmi djelovanja u HSC. Zanimljivim ciljevima čine se i knabinoidni receptori u jetri. Angiogeneza je iznimno značajan proces u razvoju fibroze i poglavito ciroze, te se razvoj lijekova koji bi mogli učinkovito i selektivno inhibirati neoangiogenezu u jetri čini vrlo značajnim ciljem (122). Na staničnom nivou daljnja istraživanja će se vj. fokusirati na HSC kao ključne stanice za pokretanje i održavanje prirocesu fibrogeneze u jetri (114). Atraktivnom se čini mogućnost selektivnog izazivanja apoptoze ili aresta staničnog ciklusa HSC-a.

Tablica 4. Eksperimentalni antifibrozni lijekovi.

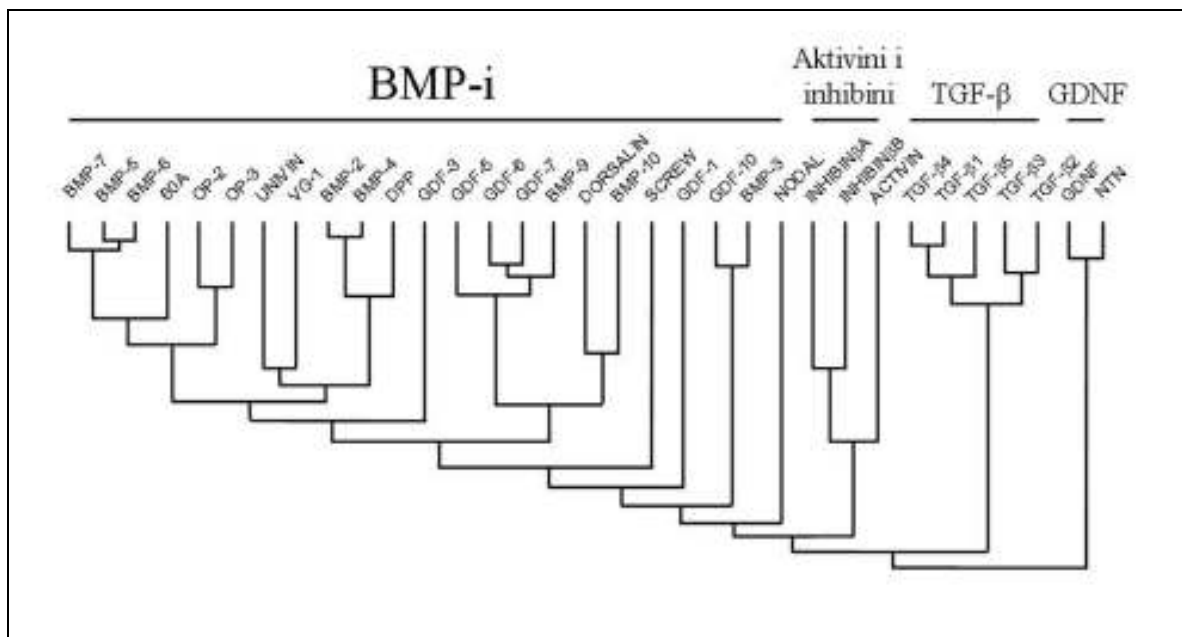
Eksperimentalni antifibrozni lijekovi	
Inhibicija aktivacije HSC i fibrogeneze	Ostali/nepoznati ili sustavni mehanizmi
<ul style="list-style-type: none"> • Antagonisti kanabinoidnih receptora • Rapamicin • Mikofenolat • Gliotoksin • Pentoksifilin • Antagonisti endotelina • Prazosin • ACE inhibitori • Retinoična kiselina • Anti-TGFβ • Folistatin 	<ul style="list-style-type: none"> • Prostaglandini • Adiponektin • Antikoagulansi • Anti IL-1 • Oktreotid • HGF • Aktivacijski protein HSC • Deplecija C5 • 5-lipoksigenazni inhibitori • Angiostatin • Anti-TNFα • Inhibicija CTGF • Relaksin

Zaključno, iako su temeljem bazičnih istraživanja rasvijetljeni brojni mehanizmi fibrogeneze u jetri, te otkriveni, a dijelom na eksperimentalnom modelu i testirani brojni potencijalni lijekovi, većina ih nije doživjela kliničku primjenu. Uzimajući u obzir težinu i moguće komplikacije jetrenih bolesti, kao i veliki javno-zdravstveni značaj i opterećenje za društvo, ostaje trajna potreba proučavanja patogeneze kroničnih jetrenih bolesti, poglavito procesa fibrogeneze i iznalaženje učinkovitih lijekova koji bi mogli zaustaviti taj proces ili u idealnom slučaju dovesti do reverzibilnosti jetrene fibroze.

1.2. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI

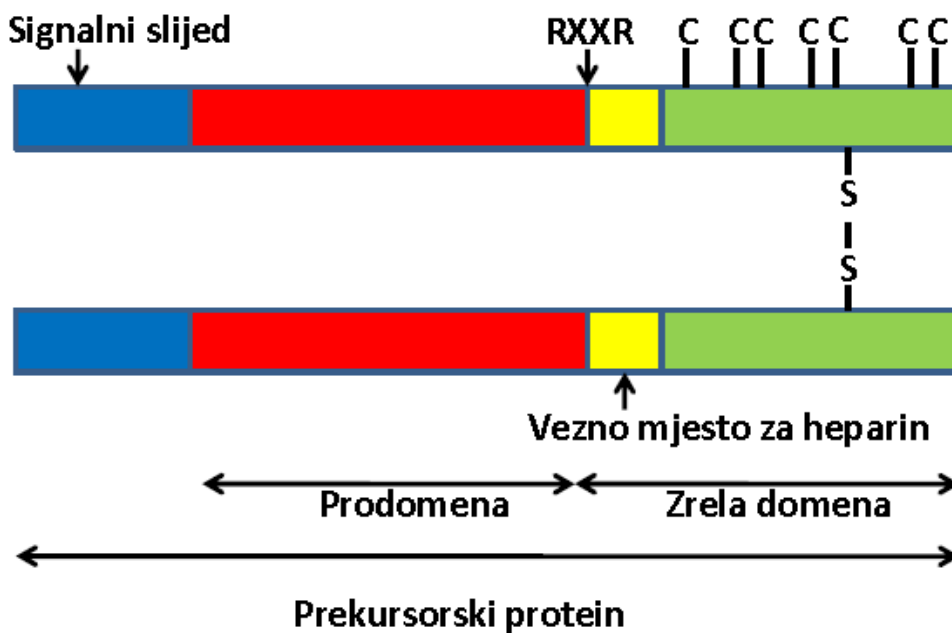
1.2.1. Definicija i podjela

Istraživanja biologije koštanog tkiva koja su provedena tijekom druge polovice prošlog stoljeća, dovela su do otkrića nove obitelji molekula koje su imale sposobnost induciranja endohondralnog stvaranja kosti na ektopičnim mjestima, tj. na mjestima intramuskularne ili subkutane aplikacije u sisavaca (138). Zbog izraženog osteoinduktivnog djelovanja u kosti i drugim tkivima, nova skupina molekula nazvana je koštani morfogenetski proteini (engl. Bone Morphogenetic Proteins- BMPs) (139). Ovaj naziv odnosi se na samo jednu partikularnu ulogu BMP-a za koje se pokazalo da su uključeni u brojne druge procese u različitim tkivima i organima. Osim ključne uloge tijekom stvaranja kostura kralješaka, uočeno je da ovi proteini imaju i veliko značenje u razvoju drugih organa i tkiva koji se stvaraju putem mezenhimsko-epitelnih međudjelovanja (140). Kao diferencijacijski čimbenici koštani morfogenetski proteini djeluju na različite vrste mezenhimalnih stanica modulirajući njihov izražaj i potičući njihovo sazrijevanje (140, 141). U daljnjim istraživanjima pronađeni su vrlo slični proteini opisani pod različitim imenima, uključujući hrskavične morfogenetske proteine (engl. Cartilage derived morphognetic proteins-CDMPs) ili faktore rasta i diferencijacije (engl. Growth and differentiation factor-GDF) koji su također svrstani unutar BMP obitelji, unutar koje danas raspoznajemo članove od BMP-2 do BMP-16 (140). Koštani morfogenetski proteini čine jedinstvenu obitelj unutar nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF β) (Slika 4).



Slika 4. Članovi nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta (TGF- β)

Nadobitelj TGF- β proteina sastoji se od 45 članova koji su identificirani u brojnim vrstama uključujući čovjeka, miša, vinsku mušicu i *Xenopus*-a (vrsta afričke žabe: *Xenopus laevis*), uz veliku podudarnost aminokiselinskih slijedova između vrsta (140, 142). Primjerice, nađena je 98% podudarnost u aminokiselinskom slijedu proteina BMP-7 između miševa i ljudi (143, 144). Svi članovi TGF- β nadobitelji građeni su kao dimerne molekule povezane disulfidnom vezom, sastavljene od N-terminalne signalne sekvence, prodomene i zrele domene koja je smještena na karboksiterminalnom kraju. Jedinstveno strukturno obilježje TGF- β nadobitelji je regija sastavljena od sedam cisteinskih ostataka unutar zrele domene na karboksi-terminalnom dijelu molekule čija su prisutnost i relativni položaj strogo očuvani unutar vrste (Slika 5)(142-144).



Slika 5. Shematski prikaz proteinske strukture članova TGF β nadobitelji. C-cistein; S-sumpor, RxxR-mjesto odvajanja zrele domene od prodomene.

Proteini TGF- β su različiti od BMP-a i ne pokazuju sposobnost induciranja nove kosti, no igraju veliku ulogu u imunomodulaciji upalnog odgovora i poticanju fibrozne reakcije tkiva na ozljedu (137, 140, 142). Poznato je pet različitih molekula TGF- β : TGF- β 1, 2 i 3 u ljudi, TGF- β 4 u pileta i TGF- β 5 u *Xenopusu*. Oni su u udaljenom srodstvu s koštanim morfogenetskim proteinima, prema kojima pokazuju prosječnu podudarnost aminokiselinskog slijeda od oko 37% u području sa sedam cisteina (145). Ostali članovi TGF β nadobitelji su Aktivini i Inhibini, Čimbenik koji inhibira razvoj Mullerovih kanalića (eng. Mullerian inhibiting substance; MIS), te Gljalni neurotrofični čimbenik (engl. Glial derived neurotrophic factor-GDNF) koji su također srodne molekule sa aminokiselinskom sekvencom koja se podudara od 16-31% sa sekvencom BMP-a (140, 145).

1.2.2. Struktura koštanih morfogenetskih proteina

Koštani morfogenetski proteini nastaju unutar stanice kao velike prekursorne molekule tri do četiri puta veće od zrelog proteina, a sastavljene su od hidrofobnih sekrecijskih vodećih slijedova na aminoterminalnom kraju, osnovnog propeptidnog područja, te zrelog dijela koji se nalazi se na karboksiterminalnom kraju molekule propeptida gdje se nalazi i sedam cisteinskih ostataka čija prisutnost određuje pripadnost TGF- β nadobitelji (146). Proteolitičkim procesiranjem u stanici dolazi do formiranja zrelog disulfidnom vezom povezanog dimernog oblika molekule. Iako najčešće formiraju homodimere, u nekim slučajevima nastaju i heterodimerne molekule sastavljene od dvaju različitih BMP-a ili jednog BMP-a i nekog drugog člana TGF- β nadobitelji. Svi koštani morfogenetski proteini su glikozilirani, što nije tipično za druge članove TGF- β nadobitelji. Tako primjerice koštani morfogenetski proteini-2 i -3 imaju jedno glikozilacijsko mjesto za asparaginsku kiselinu, BMP-4 dva mjesta (od kojih jedno odgovara položaju u BMP-2), a BMP-5, -6, i -7 imaju tri glikozilacijska mjesta na bliskim područjima (146). U inicijalnim istraživanjima purifikacijom osteoinduktivnih sastojaka iz goveđe kosti identificirano je sedam molekula koštanih morfogenetskih proteina koji su nazvani BMP-1 do BMP-7. Usporedbom aminokiselinskih slijedova uočena je strukturna sličnost šest molekula BMP-a i njihova pripadnost TGF- β nadobitelji. Za BMP-1 se ispostavilo da nije srodan ostalim koštanim morfogenetskim proteinima i ne pripada TGF- β nadobitelji već odgovara prokolagen-C-proteinazi, te će o njemu biti riječi u posebnom odjeljku. Na temelju analize aminokiselinskog slijeda šest srodnih koštanih morfogenetskih proteina možemo ih podijeliti u tri skupine (147). Prva skupina se sastoji od molekula BMP-2 i BMP-4 kod kojih je podudarnost aminokiselinskog slijeda u zreлом dijelu molekule 92%. Drugu skupinu čine koštani morfogenetski proteini -5, -6 i 7 čija usporedna područja pokazuju homnologiju aminokiselinskog slijeda od oko 89%. Koštani morfogenetski protein -3 jedini je do danas otkriveni član treće skupine molekula koji iako ne pokazuje jasnu osteoinduktivnu aktivnost dijeli strukturnu sličnost s BMP-7 molekulom u oko 42% aminokiselinskog slijeda. Podudarnost u aminokiselinskoj sekvenci između molekule BMP-7/OP-1 i molekula BMP-2, te BMP-4 iznosi oko 60% i 58% u području C-terminalnog kraja bogatog cisteinom. Nađeno je preklapanje u 51% sekvence između molekula BMP-7 i GDF-5 (BMP-14).

Geni koštanih morfogenetskih proteina široko su dispergirani u ljudskom genomu, slično ostalim članovima TGF- β nadobitelji (144, 146, 148), što je možda moglo doprinjeti razvoju tkivno-specifičnih djelovanja pojedinih članova obitelji. Tako je gen za BMP-2 smješten an 20. kromosomu, za BMP-3 na 4. kromosomu, BMP-4 na 14. kromosomu, BMP-5 na 6. kromosomu, BMP-6 na 6. kromosomu, BMP-7 na 20. kromosomu, BMP-8 na 1. kromosomu, GDF-5 na 22. kromosomu, GDF-6 na 8. kromosomu, GDF-7 na 2. kromosomu i BMP-15 na X kromosomu. (146)

1.2.3. Stanični mehanizmi djelovanja

Molekule TGF- β nadobitelji ostvaruju svoje djelovanje vežući se na receptore tipa I i II na površini ciljnih stanica. Receptori tipa I i II su transmembranski polipeptidi koji na intracelularnom dijelu funkcioniraju kao serin/treonin kinaze. Aktivirani receptor tipa II fosforilira receptor tipa I na intracelularnom jukstramembranskom području molekule bogatom glicinom i serinom (148, 149). Poznato je 12 podvrsta receptora tipa I i 7 podvrsta tipa II za ligande iz TGF- β nadobitelji (150), među kojima 3 iz prve skupine (AcTR-1, BMPR-IA i BMPR-IB, koji se još zovu redom ALK-2, ALK-3 i ALK-6, od engl. Activin-receptor like kinase) i 3 iz druge skupine (AcTR-II, AcTR-IIB i BMPR-II) služe kao receptori za koštane morfogenetske proteine (148, 151). Djelovanje koštanih morfogenetskih proteina započinje vezanjem za dva različita tipa receptora: receptor BMP tipa IA (BMPR-IA ili ALK-3) i tipa IB (BMPR-IB ili ALK-6) u prisutnosti receptora BMP tipa II (BMPR-II) (150, 151). Osim na receptore ALK-3 ili ALK-6, molekule BMP-2, -7 i GDF-5 mogu se vezati i na aktivinski receptor tipa I (ActR-I ili ALK-2). Receptori tipa I imaju veći afinitet za koštane morfogenetske proteine, te prvi vežu svoje ligande i onda privlače receptore tipa II tvoreći na taj način heteromerni kompleks. Nakon toga receptor tipa II koji je konstitutivno aktivna kinaza vrši fosforilaciju receptora tipa I (152). Aktivirani receptor tipa I odašilje signal u stanicu vršeći fosforilaciju drugih glasnika, u ovom slučaju Smad molekula. Članovi obitelji koštanih morfogenetskih proteina imaju različit afinitet vezivanja na različite kombinacije receptora tipa I i II. Koštani morfogenetski protein-4 veže se najvećim afinitetom za receptore ALK-3 i ALK-6, BMP-7 veže se na ALK-2 i ALK-6 s mnogo većim afinitetom nego na ALK-3, a GDF-5 pokazuje veći afinitet za receptor ALK-6 u odnosu na ALK-2 i ALK-3 (153, 154).

Intracelularni prijenos signala odvija se putem Smad molekula koje imaju funkciju drugih glasnika za molekule iz TGF- β nadobitelji. Heterooligomerni Smad-kompleksi odlaze u jezgru i neposredno ili u kompleksu s drugim proteinima utječu na transkripciju specifičnih gena (155, 156). Za humane Smad molekule uočeno je kako djeluju i supresivno na razvoj tumora jer su mutirani nefunkcionalni oblici identificirani u bolesnika s kolorektalnim karcinomom i karcinom gušterače (157). Na temelju funkcionalnih značajki Smad molekule mogu se podijeliti u tri skupine: (I) molekule aktivirane receptorom (R-Smad) 1, 2, 3, 5 i 8; (II) zajednički medijator ili Co-Smad 4 i (III) inhibitorne molekule (anti-Smads)-Smad 6 i 7 (150, 151, 156, 158-160). Aktivacijom receptora tipa I dolazi do fosforilacije molekula iz skupine R-Smad. Koštani morfogenetski proteini fosforiliraju molekule Smad 1, 5 i 8, dok TGF- β fosforiliraju molekule Smad 2 i 3 (156). Citoplazmatski homodimeri molekula Smad skupine I nakon fosforilacije disociraju od receptora i stvaraju heterodimere s molekulama Smad 4 nakon čega se signal prenosi u jezgru.

Afinitet Smadova za DNA je mala, radi čega Smad kompleksi ulaze u međudjelovanja s nizom koaktivatora što je uvjet za aktivaciju ciljanih gena. Od koaktivirajućih molekula poznati su

OAZ nuklearni protein, transkripcijski faktori Cbfa (core binding factor) -1, 2 i 3, CBP/p300, SMIF, Zeb1/Zfhx1a/δEF1 (161, 162).

Negativna regulacija aktivnosti molekula BMP vidljiva je na svim dijelovima BMP/Smad signalnog puta. U ekstracelularnom prostoru BMP aktivnost je inhibirana antagonistima i pseudoreceptorima kao što su Chordin, Noggin, Follistatin, follistatin-related gene (FLRG), obitelj DAN proteina (DAN, cerberus, gremlin, protein related to Dan and cerberus (PRDC) i Dante) i BAMBI (163, 164). Chordin se vezuje s velikim afinitetom za molekule BMP-2 i -4 i sprječava njihovu interakciju s receptorima (163). Prema novijim istraživanjima pokazalo se da u Xenopusu Frizzled srodni protein- Sizzled protein, djeluje kao inhibitor signalnog puta BMP-a, inhibirajući proteolizu i inaktivaciju Chordina (165). Degradacija Chordina zbiva se posredovanjem BMP-1/Tolloid obitelji metaloproteinaza (166). Protein Sizzled onemogućava cijepanje Chordina putem metaloproteinaza, tako da gubitak proteina Sizzled rezultira pojačanom degradacijom Chordina. Noggin se veže na molekule BMP-a s velikim afinitetom i blokira njihovu interakciju s receptorima, a na sličan način djeluju i članovi DAN obitelji. Follistatin sprječava vezivanje aktivina na njegove receptore i neutralizira njegovu aktivnost, a također veže i molekule BMP-a (164). Rekombinantni mišji protein FLRG posjeduje sposobnost vezivanja aktivina i molekule BMP-2. Kao i follistatin, FLRG ima veći afinitet vezivanja za aktivin nego za molekulu BMP-2 (164). BMP and activin membrane bound inhibitor (BAMBI) djeluje kao pseudoreceptor tipa I, te vežući BMP-e onemogućava njihovo vezanje sa normalnim receptorima, pa tako i njihovo normalno djelovanje (168). Na intracelularnoj razini djelovanje BMP-a se može inhibirati na nekoliko nivoa. Molekule Smad -6 i -7 djeluju kao inhibitorne Smad molekule, od kojih Smad-7 neselektivno inhibira prijenos signala molekula TGFβ, BMP i aktivina, dok Smad-6 selektivno inhibira BMP put. Oni to ostvaruju onemogućavajući interakciju R-Smadova sa transmembranskim TGFβ/BMP receptorima tipa I, aktivacijom Smurf-1 i -2 molekula čijim djelovanjem dolazi do degradacije TGFβ/BMP receptora, zatim što djeluju kompetitivno na Smad-4, djeluju kao transkripcijski korepresori. I aktivnost I-Smadova je negativno regulirana citoplazamskim proteinima Associated molecule with the SH3 domain (AMSH i AMSH2) (169). Protein Tob veže se za R-Smad proteine i onemogućava njihovo daljnje djelovanje (170). Transkripcijski korepresor Ski veže se za Smad1, 4 i 5 i 5'-CACCT sekvencu u promotorskim regijama DNA onemogućavajući početak transkripcije (171). Nuklearni membranski protein XMAN1 antagonizira djelovanje BMP vezujući Smad 1, 5 i 8 (172). Do inhibicije BMP signalnog puta dovodi i aktivacija ERK MAP kinaze jer fosforilirajući Smad1 onemogućava učinak BMP-a na njega (173). Transkripcijski faktor CIZ (Cis-interacting zinc finger protein) veže se određenu DNA regiju (G/C)AAAAA čime inhibira konačni prijenos BMP/Smad signala (174).

1.2.4. Tkivna distribucija i biološka uloga koštanih morfogenetskih proteina

Premda su koštani morfogenetski proteini izvorno izolirani i definirani iz kosti, ubrzo je brojnim istraživanjima potvrđena ekspresija koštanih morfogenetskih proteina u mnogim drugim tkivima tijekom razvoju sisavaca kao i u odraslom organizmu (175-177). Tijekom embriogeneze koštani morfogenetski proteini djeluju kao signalne molekule potrebne za pravilan tkivni razvoj. Posebno se može istaknuti uloga molekula BMP-a u razvoju mnogobrojnih tkiva i organa koja se ostvaruje preko mezenhimalno-epitelnih interakcija (178). Tako je potvrđen njihov znatan utjecaj na razvoj muskuloskeletnog i živčanog sustava, srca, bubrega, jetre, kože, očiju i zubi (177, 179). Koštani morfogenetski proteini utječu na ekspresiju brojnih gena, od kojih na neke izravno (kolagen tipa α), a na druge neizravno tek nakon protrahirane ekspozicije (primjerice osteokalcin). Ciljni geni koštanih morfogenetskih proteina mogu se podijeliti prema svojoj strukturi i funkciji na (1) Komponente ekstracelularnog matriksa (kolagen I α 1 i I α 2, osteokalcin, osteopontin, koštani sijaloprotein); (2) Decoy-receptore (osteoprotegrin); (3) Enzime (alkalna fosfataza); (4) Faktore rasta (CTGF i Indijski hedgehog); (5) Inhibitore BMP-a (Bambi, Smad-6 i -7), (6) Transkripcijske regulatore (Msx, Dlx5 (od Drosophila distalles), Id1 (engl. Inhibitor of differentiation), Id2, Id3, JunB, Cbfa1) (148). Inaktivacijom kolagenih gena razvija se bolest Osteogenesis imperfecta (180), nedostatak osteokalcina očituje se osteopetrozom, osteopontina otežanim fibrilogenezom kolagena i usporenim cijeljenjem rana (181). Manjak alkalne fosfataze dovodi do metaboličkih (infatilna hipofosfatazija) i skeletalnih defekata, a manjak CTGF otežava proliferaciju hondrocita, akumulaciju ECM-a i angiogenezu u zonama rasta, te takom dovodi do dismorfizma skeleta (182). Nedostatak hedgehog faktora otežava proliferaciju i diferencijaciju hondrocita, što dovodi do samnjenjog rasta. Manjak Smad6 dovodi do kardiovaskularnih malformacija (183). Potpuna inaktivacija gena za Id1, Id2 i Id3 nespojiva je s životom, dovodi do teških neuralnih i hematopoetskih abnormalnosti (184). Inaktivacija Cbfa1 dovodi do smrti nakon rođenja, u potpunosti je onemogućena osifikacija, te je skelet sastavljen samo od hrskavice. U probavnom sustavu BMP-4 igra značajnu ulogu u razvoju tankog crijeva, diferencijaciji i proliferaciju splahnhičnog mezoderma, diferencijaciji glatke muskulature crijeva i formiranju piloričnog prstena (185). U razvoju jetre hepatociti nastaju iz stanica endoderma pod utjecajem FGF i BMP signala koji dolaze iz stanica mezoderma srca i mezenhima septum transverzuma (186). Mezenhimalne stanice ranog septum transverzuma produciraju BMP-2,-4 i -7, a BMP-9 djeluje kao autorini/parakrini medijator retikuloendotelnog sustava jetre. Gušterača nastaje u interakciji stanica epitela i mezenhima u procesu u kojem također vrlo važnu ulogu imaju molekule FGF i BMP obitelji. BMP-4, -5, -6 i -7 su eksprimirane za vrijeme endokrine diferencijacije stanica gušterače, a u pokusima gdje je bila zapriječena ekspresija BMP-6 došlo je do ageneze gušterače (187).

Nakon rođenja koštani morfogenetski proteini sudjeluju u homeostazi i regeneraciji adultnih tkiva. Koštani morfogenetski proteini kao pleiotropni regulatori djeluju u svim važnim koracima tkivne regeneracije: kemotaksiji stanica progenitora, mitozu, diferencijaciji i proliferaciji stanica. Molekule

BMP-a također stimuliraju stvaranje izvanstaničnoga matriksa. Zbog navedenih značajki već duže vrijeme postoji ideja o sustavnoj primjeni BMP-a za poticanje tkivne regeneracije, ali ne postoji dovoljno reproducibilnih informacija o njihovoj farmakodinamici i farmakokinetici. U mnogobrojnim studijama na animalnim modelima poput modela osteoporoze, bubrežnog zatajenja, jetrenih bolesti, ishemične bolesti srca te nekih tumora potvrđena je njihova uloga u poticanju regeneracije tkiva (188). Spoznaje o osteoinduktivnoj aktivnosti molekula BMP-2,-4,-5,-6,-7 i GDF5 dovele su nakon brojnih pretkliničkih istraživanja i do kliničke aplikacije BMP-2 i BMP-7 u liječenju fraktura kostiju (189, 190). U pretkliničkim modelima na životinjama BMP-2 i BMP-7 učinkovito su dovela do reparacije ozljeđenih zglobnih hrskavica. Imunohistokemijski i izoliranjem glasničke RNA velike količine BMP-7 pronađene su u bubregu, mokraćnom mjehuru, nadbubrežnim žlijezdama, mozgu i kalvarijskoj kosti odrasloga miša (191, 192). Ekspresija molekule BMP-7 nije potvrđena u srcu i jetri, no u jetri su nađeni njegovi receptori (193). Istraživanja rađena na embrijima miša potvrdila su nazočnost molekule BMP-7 u brojnim organima u različitoj koncentraciji ovisno o danu nakon začeća. Ekspresija glasničke RNA BMP-7 molekule bila je najviša 13. dana embrionalnog razvoja, što je u skladu s njegovom ulogom u nefrogenezi (194). Na štakorskom modelu dokazana je protektivna uloga BMP-7 u razvoju lezije miokarda u uvjetima ishemije i reperfuzije (195). Preventivnom primjenom BMP-7 smanjuje se oštećenje cerebralnog korteksa izazvano ishemijskim inzultom u štakora (196). Primjena BMP-7 nakon moždanog infarkta dovodi do značajno bržeg i većeg oporavka kognitivnih i motornih funkcija. GDF-15 djeluje neuroprotektivno na nigrostrijatalne neurone izložene učincima 6-hidroksidopamina, a GDF5 i GDF15 poboljšavaju preživljenje implantiranih dopaminergičnih neurona u ledirani striatum (197). Proučavana je i uloga BMP molekula u razvoju tumora (157). Iako su geni BMP signalnog puta rijetko zahvaćeni mutacijama, najuočljivija alteracija događa se sa Smad4 molekulom čija delecija se može naći u preko 50% karcinoma gušterače i 20% kolorektalnih karcinoma (151). Brojne molekule BMP obitelji pokazuju alteriranu (najčešće povećanu) ekspresiju kod raznih malignih tumora. Primjerice, nađena je povećana ekspresija BMP-2, -4, -5, -6, Smad-2, -3, -5 i BAMBI u kolorektalnom karcinomu (157). Povećana ekspresija BAMBI nađena je i kod hepatocelularnog karcinoma (198). U stanicama karcinoma želuca i to slabo diferenciranom tipu bila je povećana ekspresija BMP-2 i -4 što je navelo na razmišljanje da bi se ove molekule mogle koristiti kao biljezi biološkog ponašanja bolesti i rizika od metastaziranja (199). S druge strane, uočen je inhibitorski učinak BMP-2 na karcinoma želuca, a taj učinak bio ovisan o dozi (200). Supresivno djelovanje BMP-2 dokazano je i u staničnoj kulturi karcinoma dojke. U karcinomu kože povećana je ekspresija inhibitorskog Smad-7, čija se uloga u patogenezi karcinoma tumači time da se na taj način inhibira signalni put TGF β , (koji načelno djeluje antiproliferativno) te se povećava signalni put epidermalnog faktora rasta (EGF) (201). Na temelju iznesenih podataka očito je da koštani morfogenski proteini imaju vrlo važnu razvojnu ulogu tijekom embriogeneze i organogeneze, u regeneraciji i homeostazi adultnih tkiva, te su uključeni kao medijatori u razne patofiziološke procese.

Iz ovih spoznaja proizlaze i potencijalne mogućnosti terapijske primjene koštanih morfogenetskih proteina.

1.2.5. Uloga koštanih morfogenetskih proteina u jetri

Ekspresija molekule BMP-2 izražena je u odrasloj zdravoj jetri i negativno utječe na proliferaciju hepatocita. Na štakorskom modelu uočeno je smanjenje njegove ekspresije nakon parcijalne hepatektomije što ukazuje da je takva supresija bitna radi osiguranja normalne proliferacije hepatocita. Također je dokazano da BMP-2 inhibira proliferaciju Huh7 stanica hepatoma (65) BMP 4 i 7 tijekom embrionalnog razvoja reguliraju proliferaciju i diferencijaciju jetrenog pupoljka dovodeći do potpune diferencijacije hepatocita (179, 193, 202). Ekspresija BMP-4 pojačava se u jetri štakora nakon podvezivanja CBD, te dovodi do aktivacije HSC, na temelju čega je zaključeno da bi on mogao posredovati u razvoju jetrene fibroze kod ovog tipa jetrenog oštećenja. (203). Ekspresija BMP-6 nađena je u štakorskoj jetri gdje ga produciraju HSC i Kupferove stanice. U kulturi HSC uočena je njegova povećana ekspresija na poticaj TGF- β 1, te je zaključeno da bi BMP-6 mogao imati ulogu u regeneraciji jetre. (204). Uloga BMP-6 posebno je istražena u hemokromatozi, bolesti kod koje je prisutna velika količina serumskog željeza sa njegovim posljedičnim odlaganjem u jetru. Sistemska razina željeza regulirana je preko hepcidina, hormona koji se sintetizira u jetri. Njegov nedostatak ima veliku ulogu u patogenezi hemokromatoze. Hemojuvelin je koreceptor BMP signalnog puta i tek nedavno (205) je potvrđeno da je od mnogobrojnih molekula BMP u regulaciji hepcidinske ekspresije preko hemojuvelina najvažnija uloga molekule BMP-6, koja u BMP-6 knock out miševa ostvaruje specifičan terapijski učinak u snižavanju serumskog željeza. BMP-7 nastaje u kostima i bubrezima. U mišjoj jetri ga nema, ili se stvara u vrlo maloj količini, ali postoje njegovi receptori na hepatocitima (26, 193). BMP 7 smanjuje progresiju fibroze u miševa intoksiciranih s CCl₄ i onemogućava EMT hepatocita. On ubrzava regeneraciju jetre nakon parcijalne hepatektomije kod miševa, a regeneracija je bitno otežana nakon primjene antiBMP-7 protutijela (193). Međutim, postoje i drukčiji podaci prema kojima je BMP-7 povišen u plazmi bolesnika s cirozom, te je povećana njegova ekspresija u cirotičnoj jetri. Prema istim autorima BMP-7 povećava proliferaciju HSC nakon što su u kulturi inficirane adenovirusom koji kodira BMP-7. U tako BMP-7 stimuliranim HSC uočena je povećana ekspresija kolagena tipa I i fibronektina iz čega je zaključeno da bi BMP-7 mogao doprinjeti razvoju jetrene fibrogeneze (206). BMP-9 je u velikoj količini eksprimiran u fetalnoj jetri (207) gdje ga produciraju HSC, KC i endotelne stanice, te dovodi do proliferacije hepatocita (207, 208). Djelovanje na hepatocite ostvaruje putem ALK-1 receptora izazivajući jaku ekspresiju gena uključenih u proliferaciju hepatocita i fibrogenezu (209) Iz svega navedenog može se zaključiti da članovi obitelji koštanih morfogenetskih proteina imaju značajnu ulogu u razvoju i regeneraciji jetre, te kao posrednici u razvoju i inhibiciji procesa fibrogeneze.

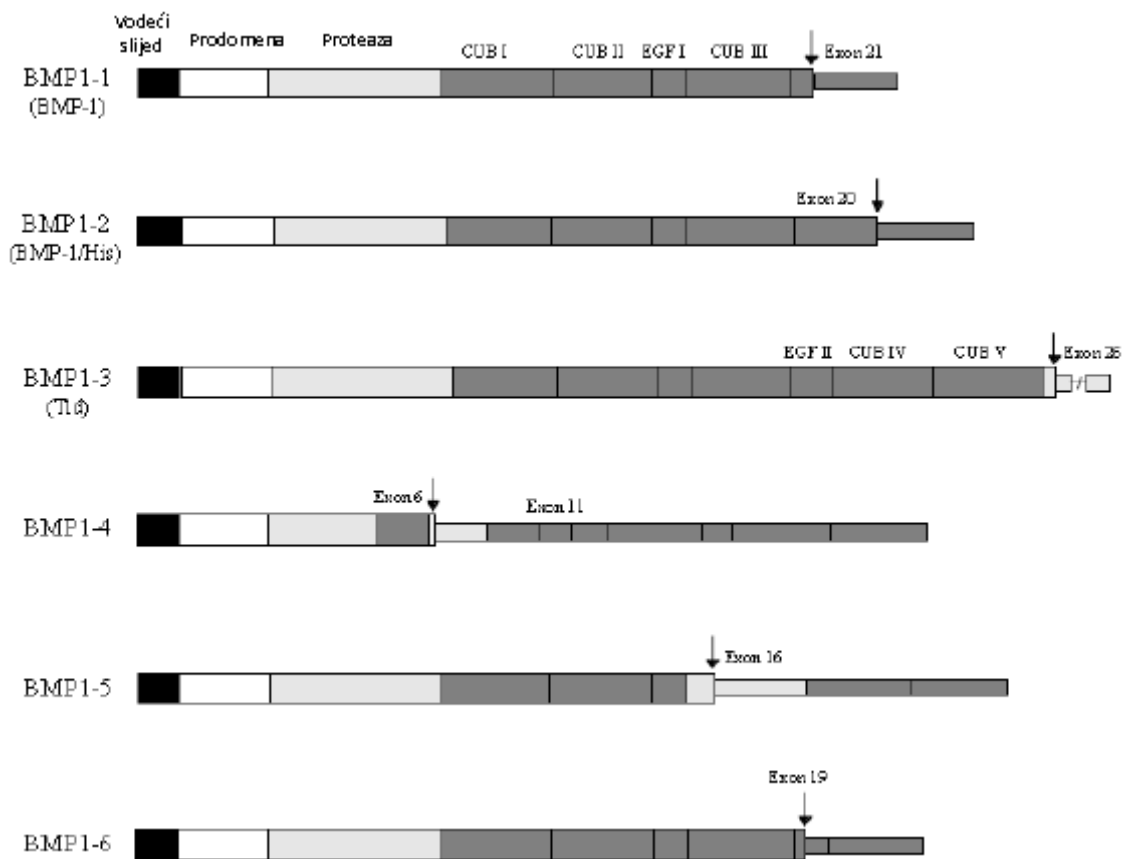
1.2.6. Koštani morfofenetski protein-1 (BMP-1)

Koštani morfofenetski protein-1 (BMP-1) izvorno je otkriven kao sastojak pročišćenog demineraliziranog osteoinduktivnog ekstrakta goveđe kosti zajedno s koštanim morfofenetskim proteinima 2-7 (138). Međutim, BMP-1 ne dijeli homologiju aminokiselinske sekvence s ostalim molekulama BMP, pa stoga nije autentični član TGF- β nadobitelji (210). Njegov aminokiselinski slijed pokazuje da na aminoterminalnom kraju postoji hidrofobno područje koje upućuje na to da je riječ o sekrecijskom čimbeniku. Pogrešno svrstavanje molekule BMP-1 unutar obitelji TGF- β rezultat je pogreške u originalnom bioeseju za osteogenezu. Daljnjim istraživanjima utvrđeno je kako je BMP-1 identičan prokolagen-C-proteinazi-1 (PCP-1), enzimu koji je bitan za pravilno raspoređivanje kolagena unutar izvanstaničnog matriksa i igra ključnu ulogu u dorzo-ventralnom embrionalnom razvoju kralješnjaka (211, 212).

Koštani morfofenetski protein-1 je sekretorna, glikozilirana, o cinku ovisna metaloproteinaza iz astacinske obitelji metaloproteinaza (211-213). Astacin je probavni enzim slatkovodnog raka *Astacus astacus* čija aminokiselinska sekvenca pokazuje 35% podudarnost sa sekvencom BMP-1 (214). Sve proteinaze iz astacinske obitelji imaju N- i C-terminalnu domenu između kojih se nalazi aktivno mjesto (215). Katalitički cink vezan je s 3 histidina, molekulom vode i tirozinom što je jedinstveno obilježje astacinskih i seralizinskih metaloproteinaza (216). Zrela molekula BMP-1 na N-terminalnom kraju ima metaloproteinaznu domenu, iza koje slijede EGF (epidermal growth factor) slične i CUB (complement-Uegf-BMP-1) domene koje su uključene u protein-protein međudjelovanja (217, 218). Za C-terminalne domene smatra se da imaju ulogu u prepoznavanju specifičnog supstrata za BMP-1 (218). U nezrelom obliku postoji još i prodomena na N-terminalnom kraju koja je značajna u procesu sekrecije BMP-1 ili njegovog održavanje u latentnoj formi intracelularno. Nedugo nakon otkrića BMP-1 pronađen je i *Drosophila* tolloid (TLD), produkt gena nužnog za dorzo-ventralno oblikovanje u ranoj embriogenezi *Drosophile*, koji je imao sličnu strukturu domena i 41% podudarnost u aminokiselinskom slijedu sa BMP-1 (219). TLD se razlikuje od BMP-1 u C-terminalnom dijelu gdje se nalazi još EGF- i CUB-domena. U sisavaca postoje 4 BMP-1/TLD-srodne metaloproteinaze (212). Gen za BMP-1 kodira i drugu, veću proteinazu dobivenu u procesu splicinga mRNA čija je struktura u osnovi identična BMP-1 te je nazvana mammalian Tolloid (mTLD) ili PCP-2. Još dvije BMP-1/TLD srodne proteinaze kodirane su različitim genima i nazvane mammalian Tolloid-like 1 i 2 (mTLL-1 i mTLL-2).

Gen za BMP-1 smješten je na 8. kromosomu i obuhvaća 26 eksona (220). Ekspresijom gena nastaje mRNA koju procesiranju različiti enzimi što je tkivno specifičan proces. Ovisno o tkivu u kojem se vrši posttranskripcijska obrada (splicing) nastaju različite izoforme genskog transkripta i posljedično različite izoforme BMP-1 proteina. Do danas je poznato 6 izoformi BMP-1 proteina: BMP-1 (BMP-1-1), BMP-1/His (BMP-1-2), tld (BMP-1-3), BMP1-4, BMP1-5 i BMP1-6 (Slika 6)

(220). U svima osim u BMP 1-4 očuvana je identična zrela domena dok su razlike u C-terminalnom kraju u smislu broja i rasporeda CUB i EGF domena čime se određuje substratna specifičnost pojedine izoforme. Tako je moguće da jedna od izoformi više djeluje na aktivaciju članova BMP obitelji, a druga u procesiranju kolagena. Iako je uočena različita ekspresija pojedinih izoformi BMP-1 u različitim tkivima/organima (220) uloge pojedinih izoformi nisu još do kraja poznate. Razlike u ekspresiji i funkciji BMP-7 u razvoju bubrega, BMP-8 u spermaticitima i BMP-9 u razvoju jetre mogu možda ukazivati na njihovu funkcijsku povezanost s koekspresijom različitih splicing izoformi BMP1 u tim organima. Potvrđena je specifična tkivna lokalizacija BMP-1-3 molekule u jetri ljudskog embrija. (221)

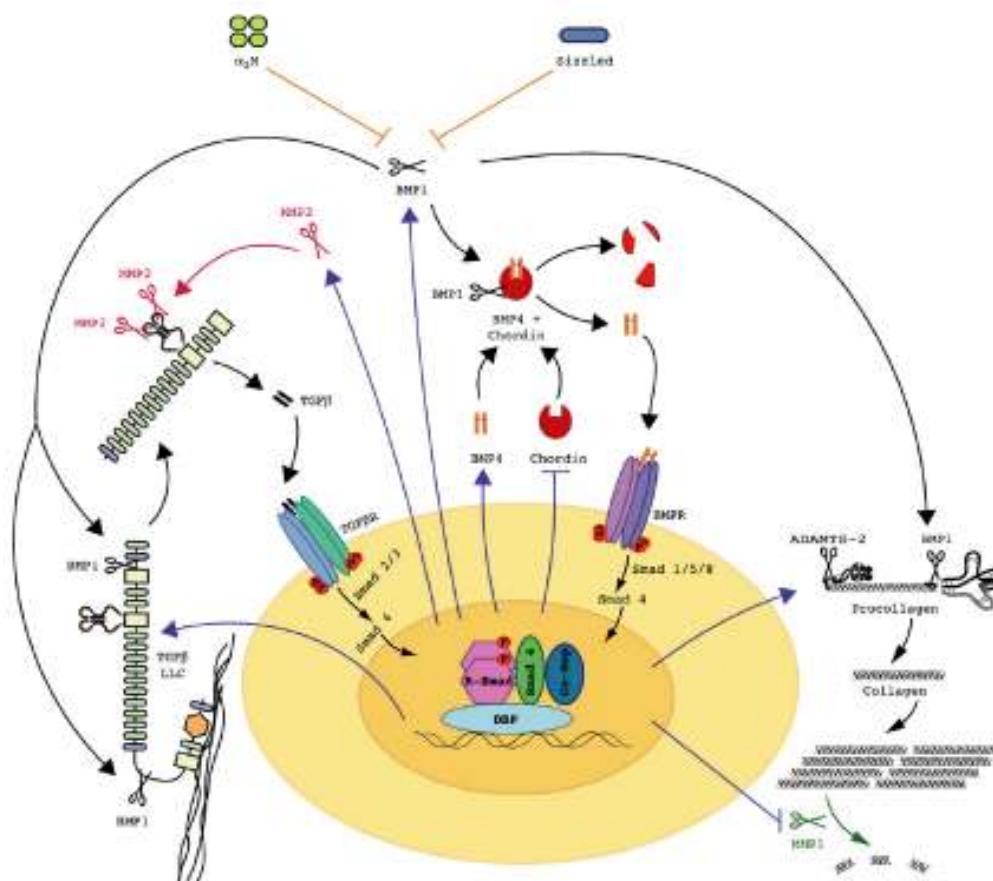


Slika 6. Izoforme glasničke RNA gena za BMP-1 nastale u postranskripcijskom procesu alternativnog splicinga. EGF- epidermal growth factor; CUB-

BMP-1/Tld - metaloproteinaze djeluju na proteolitičko sazrijevanje velikog broja izvanstaničnih proteina (Slika 7) odgovornih za formiranje izvanstaničnog matriksa (ECM), cijepajući njihove latentne oblike: (1) prokolagen C (za kolagen tipa I, II, III, V, VII) i prokolagen N-propeptide (za kolagen V i XI); (2) proteine bazalne membrane (Prolaminin-5 i perlekan); (3) Small leucine-rich

proteoglycans (SLRP)- probioglukan i osteoglicin; (4) SIBLING protein (Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) – Dentin matrix protein-1; (5) enzime (pro-lizil oksidaza) (213, 222).

Proteinaze BMP-1 uključene su u aktivaciju nekih članova TGF- β nadobitelji uključujući BMP-2 i BMP-4, TGF- β 1 i faktore rasta i diferencijacije GDF-8 i GDF-11 (213). Proteini BMP-2 i -4 aktiviraju se cijepanjem njihovog izvanstaničnog antagonista Chordina putem BMP-1 proteinaze (223). Molekule TGF- β 1 secerniraju se iz stanice u nezreloj formi s prodomenama na N-terminalnom kraju. Prodomene se još zovu Latency associated peptides (LAP) putem kojih je TGF- β 1 vezan za proteinski nosač Latent TGF- β binding protein (LTBP). Da bi se TGF- β aktivirao potrebno ga je prvo osloboditi od LTBP što se postiže djelovanjem BMP-1 (224), nakon čega se djelovanjem MMP-2 i vjerojatno MMP-9 odvajaju LAP peptidi čime TGF- β stječe punu funkcionalnu sposobnost. Molekule GDF-8 (poznat i kao miostatin, protein koji inhibira rast skeletne muskulature) i GDF-11 (inhibira neurogenezu) aktiviraju se djelovanjem BMP-1 koji odvaja prodome od zrelih proteina čime oni stječu punu funkcionalnu aktivnost (225).



Slika 7. Shematski prikaz djelovanja BMP-1/TLD-sličnih proteinaza (Izvor: Ref.213). Kratice: α 2M (α 2 makroglobulin); MMP (matriks metaloproteinaza); TGF β (transformirajući čimbenik rasta β); BMP (koštani morfogogenetski protein); ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif).

Aktivnost BMP-1/TLD proteinaza modulirana je djelovanjem endogenih pojačivača i inhibitornih molekula. Procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1) deseterostruko pojačava prokolagen-C proteinaznu aktivnost BMP-1/TLD proteinaza. To ostvaruje na način da se svojim CUB domenama izravno vezuje na prokolagen-C propeptide kolagena dovodeći do konformacijskih promjena prokolagena zbog kojih se na njih lakše veže i ostvaruje svoje proteolitičko djelovanje molekula BMP-1 (226). Specifični inhibitori BMP-1/TLD proteinaza su α 2-makroglobulin (227) i Sizzled protein (Secreted frizzled-related protein) (165).

Odnedavno poznato je da molekula BMP-1 cirkulira temeljem čega se može pretpostaviti da ima značajnu ulogu u održavanju homeostaze mnogobrojnih organa (228). U modelu renalne insuficijencije izazvane u štakora, aplikacijom antitijela na BMP-1-3 molekulu zabilježeno je značajno veće preživljenje i poboljšanje renalne funkcije kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu, te smanjenje fibroze u bubrezima (221).

2. HIPOTEZA

Fibrogeneza je jedan od najprominentijih patofizioloških procesa u nizu kroničnih difuznih bolesti jetre. Proces fibrogeneze karakteriziran je usporednim stvaranjem izvanstaničnog matriksa i njegovom razgradnjom pomoću tkivnih metaloproteinaza. U cirozi količina vezivnog tkiva u jetri može biti i do 10 puta veća u odnosu na zdravu jetru. U ovom istraživanju očekujemo da djelujući putem specifičnih morfogenih molekula i protutijela na njima srodne molekule možemo utjecati na smanjenje prekomjernog odlaganja veziva u štakorskom modelu jetrene fibroze. Isto tako očekujemo da se takav potencijalno pozitivni terapijski učinak odrazi na povećanom preživljenju životinja, te korekciji biokemijskih, histoloških i ekspresijskih markera jetrene fibroze.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- 1) Analizirati promjene tkivne i genske ekspresije koštanih morfogenetskih proteina u procesu eksperimentalno izazvane jetrene fibroze kod štakora.
- 2) Istražiti može li se primjenom koštanih morfogenetskih proteina i protutijela na njima srodne molekule zaustaviti ili značajnije smanjiti razvoj jetrene fibroze u odnosu na kontrolnu skupinu životinja.
- 3) U životinja s već uznapredovalom jetrenom fibrozom istražiti može li se primjenom koštanih morfogenetskih proteina i protutijela na njima srodne molekule produžiti preživljenje životinja, korigirati biokemijske parametre jetrene lezije i reducirati ili zaustaviti odlaganje fibroznog tkiva u jetri pozitivno djelujući na gensku ekspresiju molekula koje su uključene u tkivnu regeneraciju.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni muški štakori soja Sprague-Dawley u dobi od 5 mjeseci, iz uzgoja tvrtke "Harlan Winkelmann", Borchon, Republika Njemačka. Životinje su bile teške oko 300 g. U svakom kavezu bile su smještene dvije životinje, sa slobodnim pristupom vodi i peletiranoj hrani (Harlan Teklad, Borchon, Germany), koja sadržava 1,00% kalcija, 0,65% fosfora i 2,40 KIU vitamina D3 po kilogramu.

4.2. Protutijela

Poliklonsko zečje protutijelo na BMP 1-3 molekulu (BMP1-3Ab) dobiveno je imunizacijom zečeva specifičnim sintetskim peptidom: BMP-1-3 (aa759-772; CTSPNWPDKYPSKKE) (Invitrogen Corporation Carlsbad, SD) te je korišteno i za terapiju i za imunohistokemijsku analizu. Zečje poliklonsko protutijelo na BMP-6 molekulu (Genera istraživački laboratorij) i mišje monoklonsko protutijelo na BMP-7 molekulu (12G3, Genera istraživački laboratorij) korišteni su za isključivo za imunohistokemijsku analizu.

4.3. Proteini

Rekombinantni humani BMP-7 (rhBMP-7), c=1mg/mL (Genera istraživački laboratorij) korišten je za sistemsku terapiju u *in vivo* životinjskom eksperimentalnom dijelu pokusa.

4.4. Eksperimentalni model jetrene fibroze

Za izazivanje jetrene fibroze/ciroze kod štakora korišten je CCl_4 što je u dosadašnjim istraživanjima najčešće primjenjivan i najreproducibilniji model jetrene fibroze (229, 230).

Pripremanje CCl_4 za intraperitonealnu primjenu

Korištena je stock otopina CCl_4 (Kemika) i maslinovo ulje kao otapalo. CCl_4 i maslinovo ulje miješno je u sterilnoj jedinici u omjeru 1:9, kako bi se dobila 10% otopina.

Životinje su podijeljene u dvije skupine: preventivsku i terapijsku.

U preventivski dio pokusa (**Pokus A**) uključeno je 7 eksperimentalnih skupina životinja: **1**) negativna kontrola, samo maslinovo ulje intraperitonealno (i.p.) 2x tjedno (n=8); **2**) pozitivna kontrola (Kontrola A), 10% CCl_4 i.p. 1ml/kg, 2x tjedno (n=8); **3**) 10% CCl_4 i.p. 1ml/kg+ rhBMP-7 i.v. 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2x tjedno (n=8); **4**) 10% CCl_4 i.p. 1ml/kg+ BMP1-3 Ab i.v. 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2x tjedno (n=8); **5**) 10% CCl_4

i.p. 1ml/kg+ BMP1-3 Ab i.v. 15 µg/kg, 2x tjedno (n=8) ; **6**) 10% CCl₄ i.p. 1ml/kg+ BMP1-3 Ab i.v.2,5 µg/kg+ rhBMP-7 i.v.300 µg/kg, 2x tjedno (n=8); **7**) 10% CCl₄ i.p. 1ml/kg+ BMP1-3 Ab i.v. 15 µg/kg+ rhBMP-7 i.v.300 µg/kg, 2x tjedno (n=8). Ovaj dio pokusa trajao je 14 tjedana.

U terapijski dio pokusa (**Pokus B**) uključene su 32 životinje koje su najprije kroz 14 tjedana dobivale 10% CCl₄ i.p. 1 mL/kg 2x tjedno u cilju razvoja uznapredovale fibroze/ciroze (očekivani stadij fibroze odgovarao bi onom dobivenom kod životinja koje su predstavljale pozitivnu kontrolu Pokusa A).

Nakon toga prestalo se sa primjenom CCl₄ te su životinje randomizirane u 4 eksperimentalne skupine: **1**) kontrolna skupina, bez terapije (n=8); **2**) BMP1-3 Ab i.v.2,5 µg/kg, 2x tjedno (n=8); **3**) rhBMP-7 i.v.300 µg/kg, 2x tjedno (n=8); **4**) BMP1-3 Ab i.v. 2,5 µg/kg+ rhBMP-7 i.v.300 µg/kg, 2x tjedno (n=8). Ovaj dio pokusa trajao je dodatna 4 tjedna nakon prestanka aplikacije CCl₄, tj. ukupno 18 tjedana od početka pokusa (14 tjedana primjene CCl₄ + 4 tjedna bez CCl₄).

Broj životinja u svakoj skupini (n=8) određen je na temelju brojnih do sada objavljenih studija koje su koristile ovaj model eksperimentalno izazvane jetrene fibroze, a izračunat je primjenom Lehrove formule (230).

4.5. Izolacija jetrenoga tkiva

Nakon otvaranja trbušne šupljine prikazana je cijela jetra. S obzirom na moguću nejednolikost u tkivnoj distribuciji fibroze za histološku analizu je korišten dio jetrenoga tkiva iz lijevog i dio iz srednjeg jetrenog režnja, kako je to predloženo u ranijim studijama (231). Tkivo je fiksirano u 10% formalinu. Za izolaciju RNA dio jetrenog tkiva je stavljen u TRIzol, dok je drugi dio brzo smrznut u tekućem dušiku za određivanje koncentracije hidroksiprolina.

4.6. Izolacija RNA, sinteza cDNA i kvantitativni PCR (qRT-PCR)

RNA je izolirana iz tkiva jetre po žrtvovanju nakon 14 tjedana pokusa (Pokus A, preventivski) i nakon 18 tjedana (Pokus B, terapijski) koristeći TRIzol (Invitrogen). Komplementarna DNA (cDNA) sintetizirana je i umnožena od 1µg ukupne RNA pomoću Super Script III First Strand Synthesis kita (Invitrogen) prema uputama proizvođača. Reakcije su napravljene u GeneAmp 4800 Thermal Cycler (PerkinElmer Life Sciences). Ekspresija gena od interesa mjerena je pomoću LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kita (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) u LightCycler instrumentu (Roche Diagnostics), prema uputama proizvođača. Početnice su dizajnirane od mRNA sekvence za štakorske gene iz baze podataka dostupne na PubMed-u (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12159>) (232), a program za dizajn početnica je on-line dostupan na sljedećoj stranici: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=NcbiHomeAd# (233).

Popis početnica za sintezu cDNA:

Bmp-1 (5'CCCTGAGTATCCCAATGGCTA, 3'GACACGACCATACTGATACACC);

Bmp-2 (5'CTCAGCGAATTTGAGTTGAGGC, 3'GTGCAAGGTAGTTGATCTTCGG);

Bmp-4 (5'GACTTCGAGGCGACACTTCTA, 3'AATGTACTCCCTAGAAATGGCCG);

Bmp-6 (5'CAACGCCCTGTCCCAATGAC, 3'GTGAGGAACTTGGCGTTCTCA);

Bmp-7 (5'ACGGACAGGGCTTCTCTAC, 3'AAGGTGGGAGCTATGGTGGTA);

Tgfb 1 (5'TCCAAAGATTTAACATCTCCAACC, 3'GGTGATCCTTTTTTTTGTCCACCCT);

Chordin (5'TCCAGAGCATCGCAGTTACAG, 3'CCGAGTTCAAATGCGAAGAGA);

Col1A1 (5'TGTGTGCGATGACGTGCAAT, 3'ACATCCTCAGCTCCCTGGG);

Fibromodulin (5'ACATGGCAACCAGATTACCAG, 3'GAGTGCCGGAATATAGAGGGTG);

α -SMA: (5'CGATAGAACACGGCATCATC, 3'CATCAGGCAGTTCGTAGCTC);

GAPDH (5'ATGATTCTACCCACGGCAAG, 3'CTGGAAGATGGTGTGGGTT).

Analizirana je ekspresija četiriju „housekeeping“ gena i programom geNorm <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm> (234) identificiran je najprikladniji referentni gen. Gen za GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza) je izabran kao normalizator (235). Komparativna CT (od engl. Cycle threshold) metoda ($\Delta\Delta CT$) korištena je za relativno prikazivanje genskog izričaja (236) prema formuli $FC=2^{-\Delta\Delta CT}$. Rezultati su prikazani kao relativna promjena ekspresije gena u odnosu na kontrolni uzorak (broj puta promjene ekspresije; engl. Fold-change (FC)). Kratica CT označava ciklus u kojem se po prvi put signal ciljnih gena izdigne iznad praga detekcije. Prva delta u formuli označava razliku vrijednosti za house-keeping gene i gene od interesa, a druga delta označava razliku između srednjih vrijednosti kontrolne skupine i istraživane skupine.

4.7. Histologija

4.7.1. Klasična patohistološka analiza

Korištenjem mikrotoma izrezani su 2-4 μm debeli rezovi jetrenog tkiva uklopljenog u parafinski blok koristeći se mikrotomom. Rezovi su obojeni hemalaun-eozinom i toluidinom za prikaz osnovne građe jetrenog tkiva, upale, nekroze, stanične apoptoze i mitoze. Za utvrđivanje zastupljenosti i distribucije jetrene fibroze korišteno je Masson Trichrome bojenje (237), te posebno bojenje za kolagen Sirius red (121). Sirius red bojenje napravljeno je na deparafiniziranim i hidratiziranim rezovima jetre koji su najprije kratko obojeni (8min) u heamatoxylinu kako bi se obojile jezgre. Nakon ispiranja tekućom vodom (10 min) preparati su inkubirani sat vremena sa Sirius red F3B bojom

u koju je dodana 1,2% vodena otopina pikrične kiseline. Preparati su isprani u octenoj kiselini dva puta, dehidrirani u tri izmjene 100% alkohola. Kolagen se pod svjetlosnim mikroskopom prikazuje crveno na svijetložutoj pozadini. U patohistološkoj analizi procjenjivan je stadij jetrene fibroze primjenom bodovnog sustava po Nanji (238). Ovaj bodovni sustav odabran je zato jer uvažava patogenetski slijed zbivanja kod primjene CCl₄ gdje jetrena lezija počinje u zoni 3 jetrenog režnjača i najprije izaziva pericentralnu fibrozu. Prema Nanji fibroza se dijeli u 4 stadija: 1-zadebljanje kolagena oko centralnih vena i nekoliko tankih vezivnih septa; 2- tanka septa s nepotpunim premoštavanjem između portalnih prostora; 3-tanka septa s obilnim premoštavanjima; 4-debela septa s potpunim premoštavanjima portalnih regija i pojavom nodula.

Svi histološki bodovni sustavi za procjenu jetrene fibroze su semikvantitativni, te njihovi stadiji u osnovi predstavljaju kategorijske, a ne kontinuirane varijable (97). Također unutar istog stadija moguća je značajna razlika u količini fibroznog tkiva u jetri. Zbog toga su u analizi zastupljenosti (količine) fibroze u jetri korištene još morfometrijska analiza i određivanje koncentracije hidroksiprolina u tkivu jetre, kako je učinjeno i u ranijim studijama (121, 239-241).

4.7.2. Morfometrijska analiza zastupljenosti fibroze u jetri

Histološki rezovi obojeni Sirius red metodom korišteni su za mjerenje količine fibroze u jetri. Svaki preparat pregledan je mikroskopom (Olympus Provis mikroskop (Campbell, CA) i slikan (povećanje 4x, objektiv 4x/0.13 UPI anFI) na 4 različita mjesta čime je obuhvaćena cijela površina preparata dostupna za analizu, s tim da analizom nisu obuhvaćeni oni dijelovi preparata koji su sadržavali presjek kroz veću krvnu žilu jer bi kolagen u stijenci takve žile značajno utjecao na konačni rezultat. Na dobivenim slikama računalno je provedena morfometrijska analiza korištenjem softverskog paketa Sform (Vams, Zagreb). Zastupljenost fibroze u pojedinom preparatu izražena je kao postotak crveno obojene površine (Sirius red boja) u odnosu na preostalu žuto obojenu pozadinu preparata (121, 239).

4.7.3. Imunohistokemija

Za imunohistokemijsku analizu korištena su primarna protutijela na BMP-1-3, BMP-6 i BMP-7 navedena u odjeljku 4.2. Analiza je provedena na deparafiniziranim rezovima jetrenog tkiva koristeći imunoperoksidazni detekcijski sistem u komercijalno dostupnom kitu (Zymed, San Francisco, CA), prema uputstvima proizvođača. Rezovi parafinskih kocki debljine 5 µm fiksirani na predmetna stakalca deparafinizirani su u ksilenu (Kemika, Hrvatska), rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (95%;70%;50%)(Kemika, Hrvatska), te isprani u fosfatnom puferu (PBS, engl. Phosphate Buffer Saline). Preparati su potom fiksirani u metanolu (Kemika, Hrvatska). Kako bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza u metanol za fiksiranje dodan je 3% vodikov peroksid (Kemika,

Hrvatska) tijekom 15 min na sobnoj temperaturi. Po završetku fiksacije stakalca su ponovno isprana u PBS-u. Demaskiranje antigena provedeno je kuhanjem preparata u citratnom puferu pH 6.2 (Dako Corporation, SAD) kroz 15 minuta u mikrovalnoj pećnici na 700 W. Potom su preparati ohlađeni na sobnu temperaturu te isprani u PBS-u. Nespecifično vezivanje je blokirano s DAKO® Protein Block Serum-Free (DAKO Corporation, SAD) u vlažnoj komori kroz 10 min pri sobnoj temperaturi. Zatim je na preparate nakapano primarno Preparati su s primarnim protutijelom inkubirani 90 minuta u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije s primarnim protutijelom stakalca su isprana tri puta u PBS-u. Potom su preparati inkubirani sa sekundarnim protutijelom kroz 25 minuta te s Substrate_Chromogen System (DAB) (DAKO Corporation, SAD) u cilju vizualizacije pozitivne reakcije. Boja razvijena u hladnoj vodovodnoj vodi. U ovome eseju proteini se boje smeđom bojom. Svaki rez je analiziran u cjelokupnom području te su rezultati izraženi kao: **0** (negativna reakcija), **1** (slaba obojenost: do 1/3 svih tkivnih struktura na preparatu (stanica i veziva)), **2** (srednja obojenost: 1/3-2/3 svih tkivnih struktura na preparatu), **3** (intenzivna obojenost >2/3 svih struktura na preparatu) (243). Uzorci su pregledani i slikani pomoću Olympus Provis mikroskopa (Campbell, CA) povećanje 10x (objektiv 10x/0.30, UPIanFI Ph1).

4.8. Određivanje hidroksprolina u tkivu jetre

Koncentracija hidroksprolina u jetrenom tkivu određivana je modificiranom metodom po Bergman-u i Loxley-u (240, 241). Ukratko, uzorak tkiva jetre hidroliziran je u 5mL 6N HCl kroz 18h na 110°C. Filtrirana otopina je neutralizirana pomoću 10N NaOH i 3N HCl nakon čega joj je dodan isopropanol u acetatno-citratno puferiranom Chloraminu T i Ehrlichov reagens. U dobivenoj otopini spektrofotometrijski je određena absorbancija na 560 nm, a rezultat je izražavan u µg hidroksprolina u mL otopine po gramu tkiva jetre.

4.9. Statistička analiza

Za analizu preživljenja životinja po skupinama planirano je korištenje Kaplan-Meierovih krivulja, a za značajnost mogućih razlika Log rank test. Razlike u kvantitativnim obilježjima među skupinama koje se izražavaju na kontinuiranoj skali (morfometrijski dobivene vrijednosti u zastupljenosti fibroze, koncentracija hidroksprolina u jetri, vrijednosti genske ekspresije, vrijednosti biokemijskih nalaza u krvi) analizirane su ANOVA testom, a ukoliko su dobivene značajne razlike tada se za testiranje značajnosti razlike između pojedinih skupina koristio Fisher Least Significant Difference (LSD) post-hoc test. Za testiranje numeričkih kontinuiranih vrijednosti između dviju skupina korišten je t-test. Za testiranje razlika između obilježja čije se vrijednosti izražavaju na ordinalnoj skali (histološki stadiji fibroze i semikvantitativna analiza imunohistokemijskog nalaza) korišteni su neparametrijski testovi (Kruskal-Wallis za analizu između više skupina, te u post-hoc analizi Mann-Whitney test s podešavanjem razina značajnosti za razlike između dviju skupina). Za analizu razlike između dviju

skupina za vrijednosti na ordinalnoj skali korišten je Fisher exact test. Značajnima su smatrane razlike za $p < 0,05$. Statističke analize provedene su programima MedCalc verzija 11.1. i SPSS verzija 7.5.

4.10. Prikaz redosljeda istraživanja

Prema unaprijed definiranom protokolu pristupilo se izazivanju jetrene fibroze/ciroze kod štakora intraperitonealnom primjenom 10% otopine CCl_4 2x tjedno u trajanju 14 tjedana. U preventivskom dijelu pokusa (Pokus A) jedna grupa životinja dobivala je intraperitonealne injekcije maslinovog ulja i služila je kao negativna kontrola, dok je još jedna skupina dobivala CCl_4 i.p. bez primjene drugih molekula i ta je služila kao pozitivna kontrola u kojoj je analiziran prirodni tijek bolesti. U ostalim grupama koje su definirane u odjeljku 4.4. uz primjenu CCl_4 životinje su dobivale rhBMP-7, BMP 1-3 Ab u dozi 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, BMP 1-3 Ab u dozi 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kombinaciju rhBMP-7 i BMP 1-3 Ab (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i kombinaciju rhBMP-7 i BMP 1-3 Ab (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

U terapijskom dijelu pokusa (Pokus B) 32 životinje dobivale su prvih 14 tjedana samo CCl_4 , te se očekivalo da u tom razdoblju razviju uznapredovalu fibrozu/cirozu. Nakon toga prestalo se s primjenom CCl_4 i provedena je randomizacija prema kojoj jedna skupina životinja dalje nije dobivala terapiju i služila je kao kontrolna skupina za analizu prirodnog tijeka bolesti, dok su ostale 3 dobivale BMP-7, ili protutijelo na BMP 1-3 (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ili njihovu kombinaciju. Ovaj dio pokusa trajao je još 4 tjedna nakon prestanka primjene CCl_4 .

Utjecaj primjenjenih različitih protokola na životinje pratio se na slijedeće načine:

- 1) Analizom preživljenja životinja
- 2) Određivanjem biokemijskih parametara jetrene lezije: AST, ALT, bilirubin i albumini prije prve aplikacije CCl_4 , te nakon 4., 8. i 14. tjedna u preventivskoj, a u terapijskoj skupini još i nakon 18. tjedna pokusa
- 3) Određivanjem zastupljenosti fibroze u jetri: patohistološkom analizom (klasičnom i morfometrijskom) i određivanjem koncentracije hidroksiprolina u jetri
- 4) Određivanjem promjena u genskoj i proteinskoj tkivnoj ekspresiji koštanih morfogenetskih proteina i komponenata izvanstaničnog matriksa .

5. REZULTATI

5.1. Analiza razvoja jetrene fibroze u štakora primjenom CCl₄ i uloge koštanih morfogogenetskih proteina u procesima fibrogeneze i regeneracije jetre

Najprije je provedena analiza djelovanja CCl₄ na razvoj jetrene lezije, kao i učinci koji se postižu nakon prestanka davanja CCl₄ („prirodni tijek bolesti“). U ovom dijelu analizom su obuhvaćene 3 skupine životinja: (1) negativna kontrola preventivnog pokusa A („Zdrave životinje“ koje su dobivale samo maslinovo ulje i.p. kroz 14 tjedana), (2) pozitivna kontrola preventivnog pokusa A („Kontrola A“ - životinje koje su 14 tjedana dobivale 10% CCl₄ i.p.) i (3) negativna kontrola terapijskog pokusa B („Kontrola B“ - životinje koje su prvih 14 tjedana dobivale 10% CCl₄ i.p., a potom 4 tjedna nisu dobivale CCl₄ niti bilo koji drugi terapijski modalitet). Učinci primjene i prestanka davanja CCl₄ analizirani su promatranjem preživljenja životinja, njihovog učinka na biokemijske parametre jetrene lezije (AST, ALT, albumin i bilirubin u krvi), te djelovanja na dinamiku razvoja fibroze jetre (što je analizirano (a) patohistološki koristeći Nanjijev bodovni sustav, (b) morfometrijskim određivanjem relativne zastupljenosti kolagena u preparatu i (c) određivanjem koncentracije hidropsiprolina u tkivu jetre). U cilju utvrđivanja uloge koštanih morfogogenetskih proteina tijekom procesa oštećenja i oporavka jetre analizirana je ekspresija njihovih gena, zatim gena inhibitornih molekula za koštane morfogogenetske proteine (Chordin) kao i gena faktora rasta (TGFβ1), aktivacijskih biljega hepatičnih staničnih stanica (αSMA), i molekula izvanstaničnog matriksa (kolagen tip 1 i fibromodulin).

5.1.1. Preživljenje životinja

Sve zdrave životinje, kao i sve životinje koje su činile pozitivnu kontrolu pokusa A (ciroza) i negativnu kontrolu pokusa B (faza oporavka od ciroze) preživjele su cijelo vrijeme trajanja pokusa.

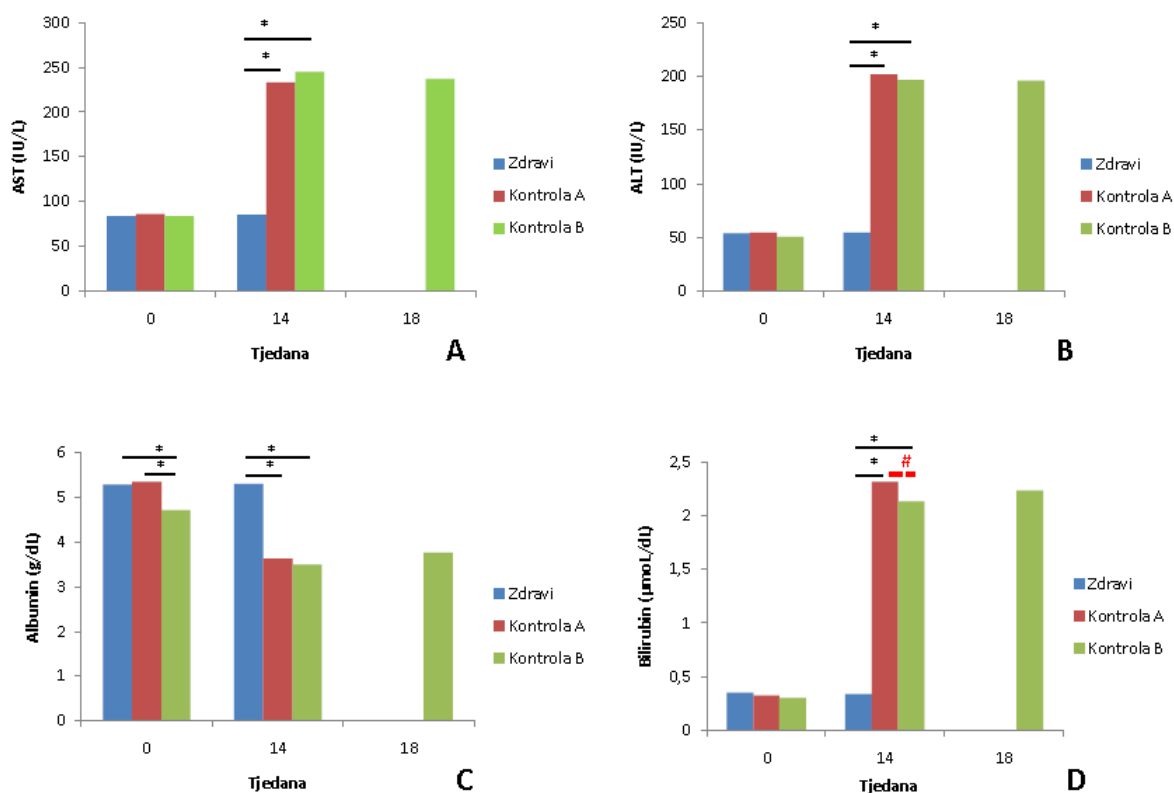
5.1.2. Analiza biokemijskih pokazatelja jetrene lezije

Prije početka pokusa nije bilo značajne razlike u vrijednostima AST, ALT i bilirubina između zdravih životinja, te životinja koje su činile kontrolnu skupinu pokusa A i B, dok je vrijednost albumina bila niža kod grupe kontrolnih životinja za pokus B u odnosu na zdrave ($p=0,001$) i kontrolne životinje pokusa A ($p<0,001$). Nakon 14 tjedana pokusa (kraj pokusa A i točka neposredno prije početka pokusa B) zdrave životinje očekivano su imale značajno niže vrijednosti AST, ALT i bilirubina u odnosu na kontrolnu skupinu pokusa A i B ($p<0,001$) (Tabl 5. i Slika 8).

Tablica 5. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja jetrene lezije prije početka pokusa (tjedan 0), nakon 14 i 18 tjedana pokusa.

Tjedana	AST (IU/L)			ALT (IU/L)		
	0	14	18	0	14	18
Zdravi	83,375	85,25		53,875	54,625	
Kontrola A	86,00	233,00		54,50	201,75	
Kontrola B	83,375	244,75	237,13	50,63	196,63	196,13
Tjedana	Albumin (g/dL)			Bilirubin ($\mu\text{mol/dL}$)		
	0	14	18	0	14	18
Zdravi	5,2875	5,3		0,35	0,3375	
Kontrola A	5,35	3,63		0,325	2,310	
Kontrola B	4,7125	3,5	3,76	0,300	2,130	2,230

Također su zabilježene niže vrijednosti bilirubina u kontrolnoj skupini pokusa B u odnosu na kontrolnu skupinu pokusa A, što je bilo statistički značajno ($p=0,037$).



Slika 8. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja jetrene lezije (iz uzorka krvi) zdravih životinja, kontrolne skupine pokusa A (ciroza) i kontrolne skupine pokusa B (oporavak od ciroze) prema tjednima trajanja pokusa. * $p < 0,001$; # $p < 0,05$.

Vrijednosti albumina nakon 14 tjedana bile su značajno niže u životinja izloženih djelovanju CCl₄ (Kontrola A i B) u odnosu na zdrave životinje (p<0,001). Nije nađena značajna razlika u vrijednostima AST, ALT, albumina i bilirubina kod kontrolnih životinja pokusa B nakon 18 tjedana u odnosu na stanje na kraju 14. tjedna pokusa, tj. nije uočena korekcija biokemijskih parametara jetrene lezije u fazi oporavka nakon 4 tjedna od prestanka davanja CCl₄ (p>0,05 za sve komparacije, t-test).

5.1.3. Analiza razvoja jetrene fibroze

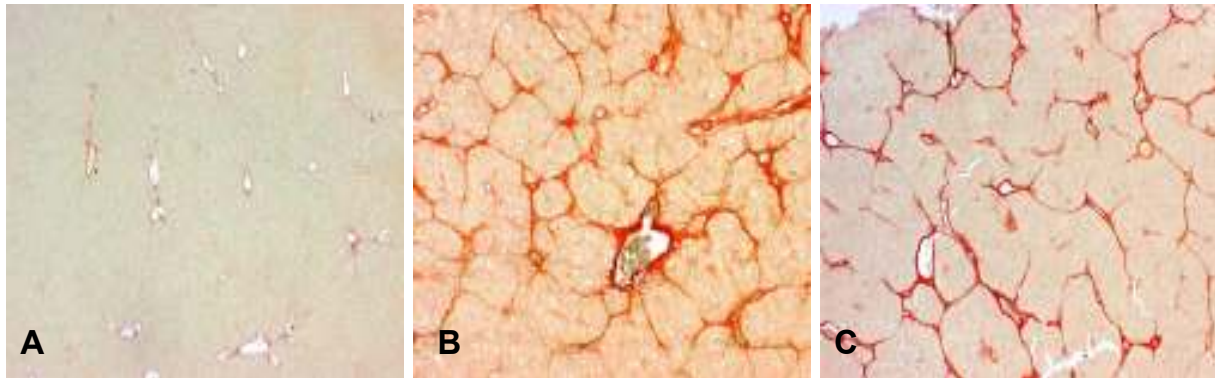
Zastupljenosti fibroze u jetri analizirana je (1) patohistološki primjenom bodovnog sustava po Nanji, (2) morfometrijskom analizom relativnog udjela kolagena na promatranom preparatu, te (3) određivanjem koncentracije hidroksiprolina u tkivu jetre. Patohistološki i morfometrijski posebno su analizirani lijevi(LR) i srednji režanj (SR) jetre. Rezultati patohistološke analize prikazani su u Tabl. 6.

Tablica 6. Patohistološki stadij fibroze po Nanji (0-4) kod zdravih životinja, životinja iz skupine koje su činile pozitivnu kontrolu pokusa A i negativnu kontrolu pokusa B.

Broj životinje	Stadij fibroze po Nanji (0-4)					
	Zdravi LR	Zdravi SR	Kontrola A LR	Kontrola A SR	Kontrola B LR	Kontrola B SR
1	0	0	4	4	4	4
2	0	0	3	3	4	4
3	0	0	4	4	4	4
4	0	0	4	4	4	4
5	0	0	4	4	4	4
6	0	0	4	4	4	4
7	0	0	4	4	4	4
8	0	0	3	4	4	4
Medijan	0	0	4	4	4	4

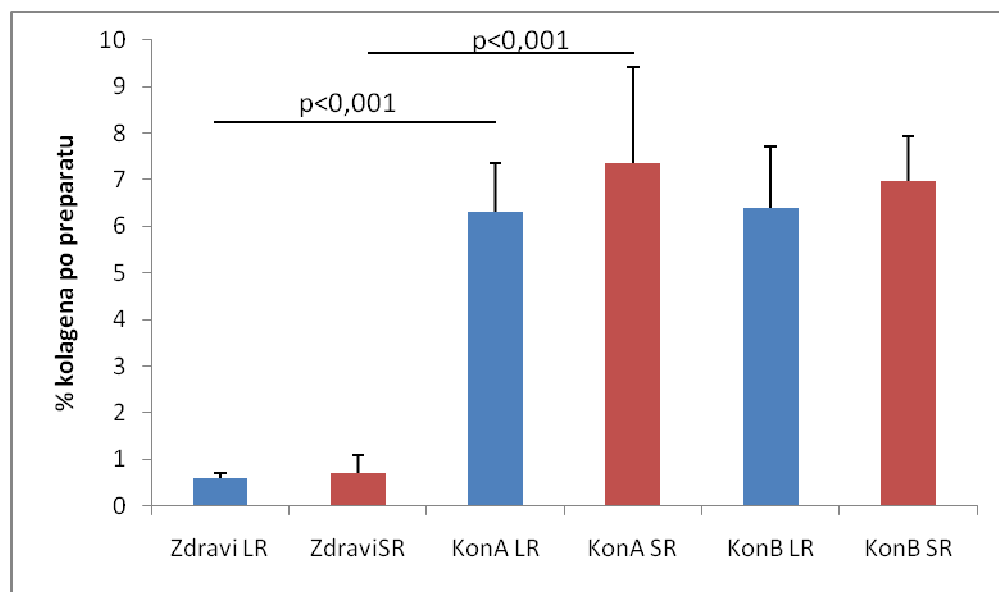
Iz Tablice 6. vidi se da je nakon 14 tjedana primjene 10% otopine CCl₄ došlo je do razvoja ciroze (stadij 4 po Nanji; Slika 9B) kod 7/8 životinja u srednjem režnju kontrolne skupine (pozitivna kontrola A), dok je kod jedne životinje zabilježen je stadij 3 fibroze. Istovremeno, u lijevom režnju stadij 4 razvio se kod 6/8 životinja, a stadij 3 kod 2/8 životinja. Sve životinje iz skupine koja je predstavljala negativnu kontrolu (dobivale samo maslinovo ulje i.p.) imale su uredan patohistološki izgled jetre, tj. stadij 0 fibroze (Slika 9A) dok je kod svih životinja koje su predstavljale kontrolu pokusa B nađen stadij 4 fibroze u oba režnja. Razlika u stadiju fibroze bila je značajna između 3 ispitivane skupine (Kruskal-Wallis p<0,0001). U post-hoc analizi značajna razlika nađena je između zdravih životinja i kontrolne skupine pokusa A (Multiple comparisons of mean ranks: p=0,006 za LR i p=0,003 za SR), te

zdravih i kontrolne skupine pokusa B ($p=0,0007$ za LR i $p=0,001$ SR). Nije bilo značajne razlike u stadiju fibroze između kontrolne skupine pokusa A i pokusa B ($p>0,05$)



Slika 9. Patohistološki nalaz srednjeg reznja jetre: (A) zdrave životinje, (B) pozitivna kontrola pokusa A, (C) negativna kontrola pokusa B. Bojenje Sirius red, povećanje 4x.

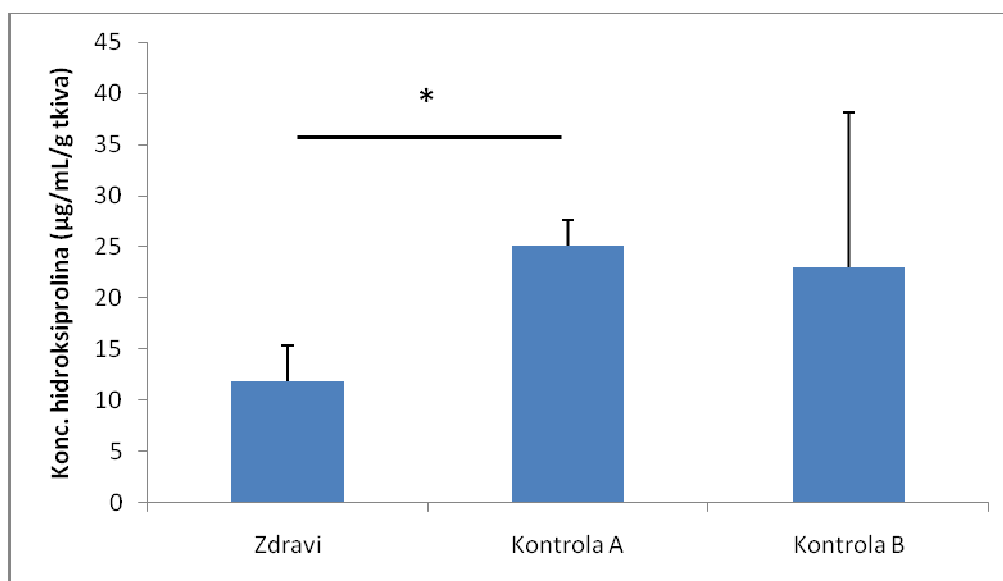
Morfometrijskom analizom uočena je značajna razlika u zastupljenosti kolagena između 3 ispitivane skupine (ANOVA $p<0,001$). U post-hoc analizi značajno veća zastupljenost kolagena nađena je kod životinja tretiranih sa CCl_4 (Kontrola A: $6,29\pm 1,06\%$ LR i $7,34\pm 2,06\%$ SR) u odnosu na zdrave životinje ($0,58\pm 0,12\%$ LR i $0,71\pm 0,39\%$ SR) ($p<0,001$; Fisher LSD test)(Slika 10), dok nije bilo razlike između životinja iz skupine Kontrola B za oba reznja ($6,393\pm 1,31\%$ LR i $6,971\pm 0,96\%$ SR) u odnosu na kontrolnu skupinu iz pokusa A (Fisher LSD test; $p>0,05$).



Slika 10. Morfometrijska analiza relativnog udjela kolagena obojenog metodom Sirius-red (% površine preparata koji je obojen u odnosu na površinu cijelog preparata) u lijevom (LR) i srednjem reznju (SR) jetre kod zdravih životinja, životinja s cirozom (KonA) i životinja u fazi oporavka nakon prestanka davanja CCl_4 (KonB).

Nije bilo značajne razlike u patohistološkom stadiju fibroze (Fisher's exact test) niti relativnom udjelu kolagena (t-test) dobivenom morfometrijskom analizom između lijevog i srednjeg režnja jetre kod zdravih životinja, kod životinja s cirozom (Kon A) i životinja u fazi oporavka (Kon B) ($p > 0,05$ za sve usporedbe).

Nađena je značajna razlika u koncentraciji hidroksiprolina u tkivu jetre između 3 uspoređivane skupine životinja (ANOVA $p = 0,018$). U post-hoc analizi značajno veća koncentracija hidroksiprolina nađena je u tkivu jetre kod CCl_4 tretiranih životinja u odnosu na negativnu kontrolu (srednja vrijednost \pm SD redom $25,17 \pm 2,41$ i $11,84 \pm 3,53$ $\mu\text{g/mL/g}$ tkiva; $p = 0,008$, Fisher LSD test) (Slika 11). Nije bilo značajne razlike u koncentraciji hidroksiprolina između negativne kontrole pokusa B ($22,936 \pm 15,234$ $\mu\text{g/mL/g}$ tkiva) i životinja s cirozom (kontrolne skupine pokusa A) ($p = 0,63$; Fisher LSD test).



Slika 11. Koncentracija hidroksiprolina ($\mu\text{g/mL/g}$ tkiva jetre) kod zdravih životinja, kontrolne skupine pokusa A i pokusa B. * $p = 0,008$; Fisher LSD post-hoc test; ANOVA.

5.1.4. Analiza genske ekspresije

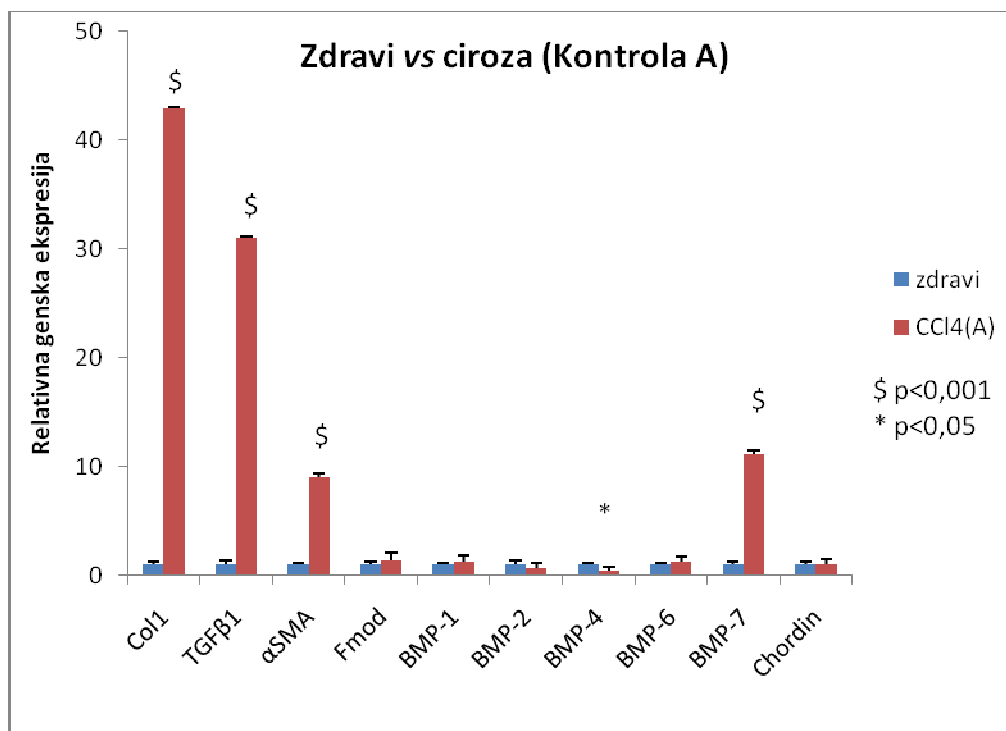
Rezultati analize promjena genske ekspresije koštanih morfogenetskih proteina i molekula izvanstaničnog matriksa između zdravih životinja, životinja s cirozom (Kontrola A) i životinja u fazi

oporavka od ciroze nakon 4 tjedna prestanka djelovanja CCl₄ (Kontrola B) navedeni su u Tablici 7. te grafički prikazani na slikama 12 i 13.

Tablica 7. Rezultati relativne ekspresije gena (qRT-PCR) molekula izvanstaničnog matriksa, faktora rasta i koštanih morfogenetskih proteina kod štakora s cirozom (Kontrola A) u odnosu na zdrave životinje. Rezultati su izraženi na komparativnoj razini kao broj puta uvećanja u odnosu na ekspresiju istog gena kod zdravih životinja. SD=standardna devijacija; Usporedbe među grupama rađene su t-testom, značajnom se smatrala vrijednost $p < 0,05$.

	<i>Colla1</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>αSma</i>	<i>Fmod</i>	<i>Chordin</i>
Zdravi	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
±SD	0,735	1,153	0,533	0,826	0,72
Kontrola A	42,888	31,071	9,008	1,377	1,085
±SD	0,467	0,264	1,091	2,147	1,05
p-vrijednost	7,27E-10	3,11E-06	2,14E-05	0,584	0,798
	<i>Bmp-1</i>	<i>Bmp-2</i>	<i>Bmp-4</i>	<i>Bmp-6</i>	<i>Bmp-7</i>
Zdravi	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
±SD	0,602	1,077	0,516	0,598	0,816
Kontrola A	1,324	0,726	0,513	1,286	11,197
±SD	1,481	1,27	0,891	1,398	0,779
p-vrijednost	0,491	0,446	0,022	0,516	4,93E-07

Iz Tablice 7. i Slike 12. vidi se da je kod životinja s cirozom došlo do značajnog porasta ekspresije gena za *Colla1*, *TGFβ1*, *αSMA* i *BMP-7* u odnosu na zdrave životinje. Istovremeno značajno je smanjena ekspresija gena za *BMP-4*, dok nije bilo značajne razlike u ekspresiji gena za *Fibromodulin*, *BMP-1*, *BMP-2*, *BMP-6* i *Chordin*.

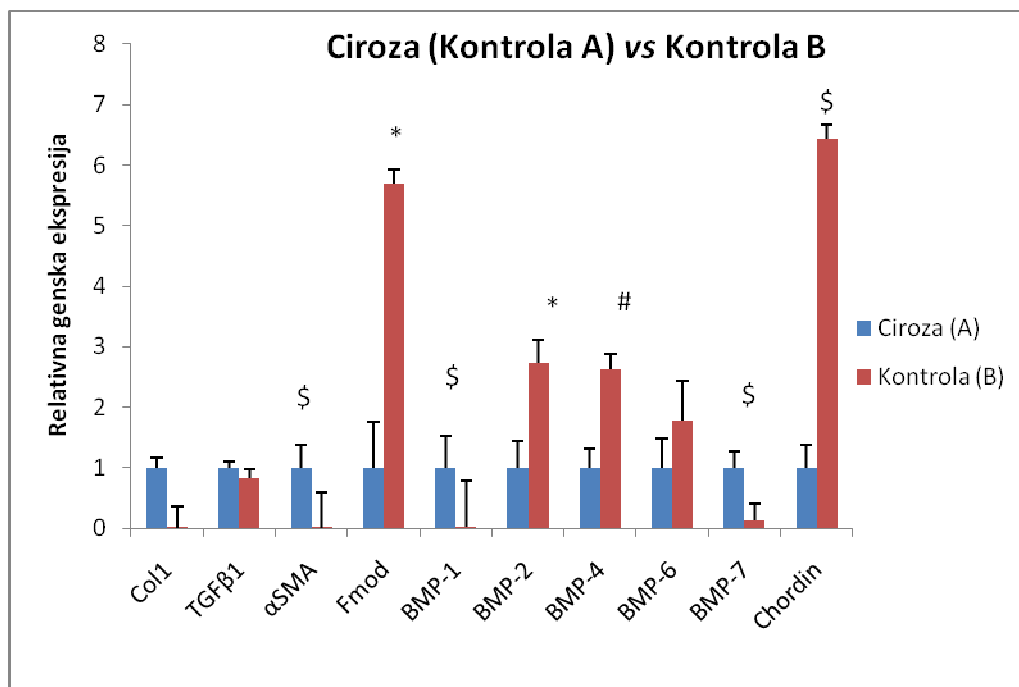


Slika 12. Grafički prikaz promjena ekspresije gena molekula izvanstaničnog matriksa, faktora rasta i koštanih morfogenetskih proteina kod štakora s cirozom (nakon 14 tjedana davanja CCl₄=Kontrola A) u odnosu na zdrave životinje (koje nisu dobivale CCl₄). Razlike su testirane t-testom; *p<0,05; \$ p<0,001.

Suprotni rezultati genske ekspresije dobiveni su usporedbom životinja koje su žrtvovane u trenutku kad se razvila ciroza (Kontrola A) i onih u fazi oporavka od toksičnog djelovanja CCl₄ (Kontrola B) gdje se promatrala potencijalna regeneracija jetre (Tabl. 8. i Slika 13). Kod životinja kod kojih je prestalo štetno djelovanje toksina došlo je do značajnog smanjenja ekspresije gena za *Colla1*, *αSMA*, *BMP-1* i *BMP-7*. Također je došlo do smanjenja ekspresije gena za *TGFβ1* što nije bilo statistički značajno. S druge strane došlo je do značajnog povećanja ekspresije gena za *Fibromodulin*, *BMP-2* i *BMP-4*, te *Chordin*. Povećana ekspresija gena za *BMP-6* nije dosegla statističku značajnost.

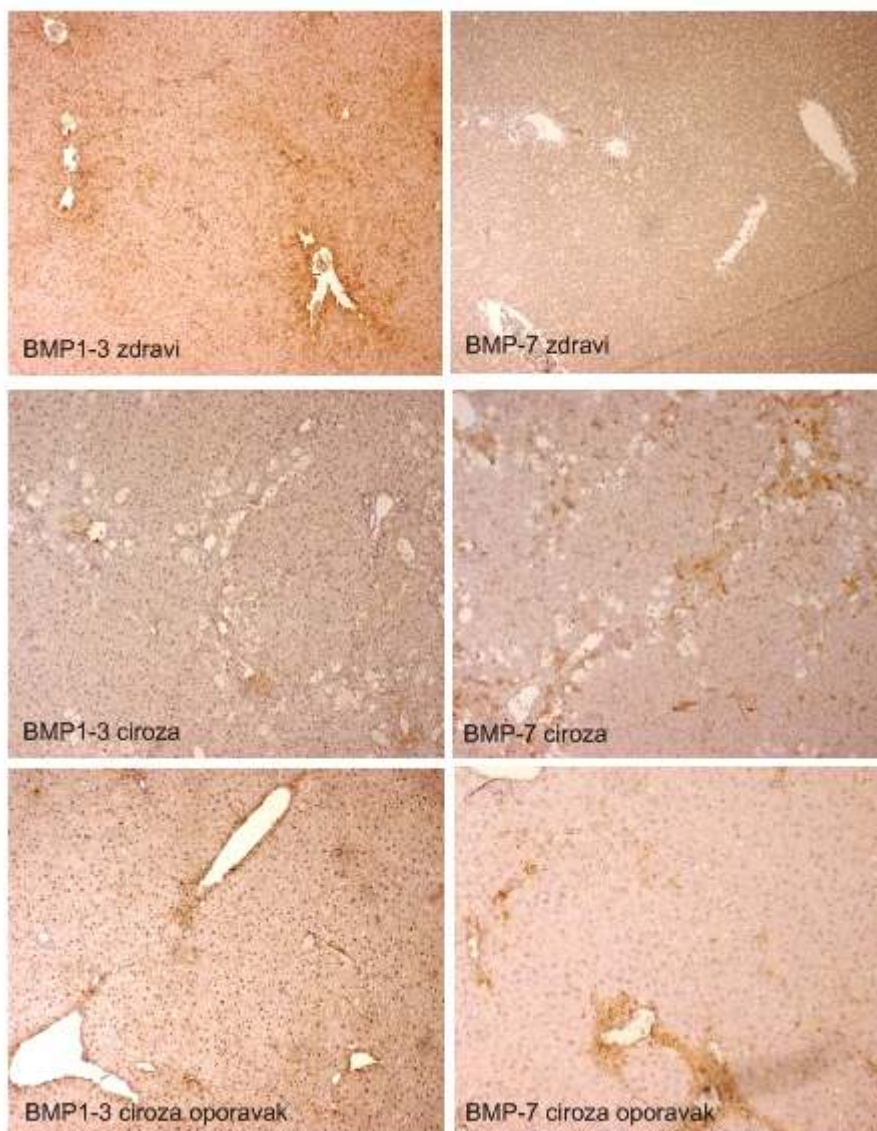
Tablica 8. Rezultati relativne ekspresije gena (qRT-PCR) molekula izvanstaničnog matriksa, faktora rasta i koštanih morfogenetskih proteina kod štakora u fazi oporavka nakon prestanka štetnog djelovanja CCl₄ (Kontrola B) u odnosu na životinje s cirozom koje su bile izložene djelovanju CCl₄ kroz 14 tjedana (Kontrola A). Rezultati su izraženi na komparativnoj razini kao broj puta uvećanja u odnosu na ekspresiju istog gena kod životinje iz kontrolne skupine A. SD=standardna devijacija; Usporedbe među grupama rađene su t-testom, značajnom se smatrala vrijednost p<0,05.

	<i>Coll1a1</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>αSma</i>	<i>Fmod</i>	<i>Chordin</i>
Kontrola A	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
±SD	0,467	0,264	1,091	2,147	1,05
Kontrola B	0,003	0,831	0,005	5,696	6,431
±SD	1,018	0,401	1,678	0,637	0,667
p-vrijednost	1,71E-09	0,142631	1,67E-07	0,01274	5,58E-05
	<i>Bmp-1</i>	<i>Bmp-2</i>	<i>Bmp-4</i>	<i>Bmp-6</i>	<i>Bmp-7</i>
Kontrola A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
±SD	1,481	1,27	0,891	1,398	0,779
Kontrola B	0,031	2,740	2,632	1,782	0,139
±SD	2,111	1,026	0,709	1,878	0,764
p-vrijednost	0,000113	0,025123	0,004018	0,332201	3,58E-06



Slika 13. Grafički prikaz promjena ekspresije gena molekula izvanstaničnog matriksa, faktora rasta i koštanih morfogenetskih proteina kod štakora u fazi oporavka nakon prestanka davanja CCl₄ (Kontrola B) u odnosu na životinje s cirozom (žrtvovane nakon 14 tjedana aplikacije CCl₄=Kontrola A). Razlike su testirane t-testom; *p<0,05; # p<0,01; \$ p<0,001.

Imunohistokemijskom analizom nije se dobila statistički značajna razlika u tkivnoj ekspresiji proteina BMP 1-3, BMP-6 i BMP-7 između zdravih, životinja s cirozom (Kontrola A) i životinja u fazi oporavka nakon prestanka aplikacije CCl_4 (Kontrola B) (Kruskal-Wallis test za BMP1-3 $p=0,127$; za BMP-6 $p=0,379$; za BMP-7 $p=0,078$) (Slika 14).



Slika 14. Imunohistokemija na BMP 1-3 i BMP-7 za zdrave životinje, životinje s cirozom (Kontrola A) i životinje u fazi oporavka od djelovanja CCl_4 (Kontrola B). Protein od interesa obojen smeđom bojom.

5.2. Analiza učinkovitosti primjene BMP-7 i/ili BMP 1-3 protutijela na razvoj jetrene fibroze

U ovom dijelu pokusa kojega smo nazvali Pokus A ili preventivski pokus 6 skupina po 8 životinja dobivalo je 10% CCl₄ i.p. 2x tjedno kroz 14 tjedana. Jedna grupa dobivala je samo CCl₄ i služila je kao pozitivna kontrola (*Kontrola A*). Ostale skupine dobivale su prema opisanom protokolu uz CCl₄ još i BMP-7 (*skupina BMP7*), BMP1-3 Ab 2,5µg/kg (*skupina BMP1-3Ab 2,5*), BMP 1-3 Ab 15 µg/kg (*skupina BMP1-3Ab 15*), te kombinaciju BMP-7 i BMP 1-3 Ab 2,5µg/kg (*Skupina Komb 2,5*) i kombinaciju BMP-7 i BMP 1-3 Ab 15µg/kg (*Skupina Komb 15*).

5.2.1 Preživljenje životinja

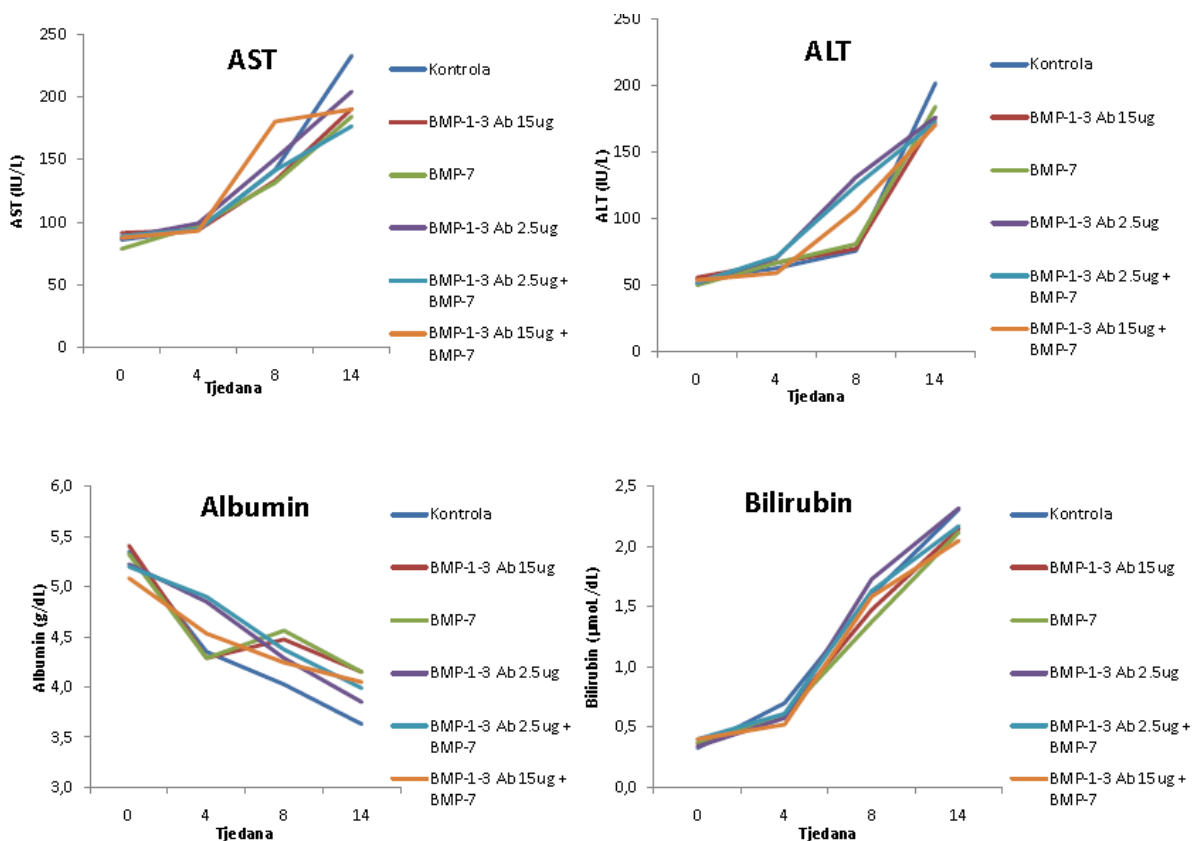
Sve životinje u svim skupinama preživjele su cijelo vrijeme trajanja pokusa.

5.2.2. Utjecaj terapijskih protokola na biokemijske parametre jetrene lezije

Nije bilo razlike u vrijednostima AST, ALT, bilirubina i albumina u serumu između skupina na početku pokusa ($p > 0,05$ za sve usporedbe; ANOVA). Na kraju pokusa (nakon 14 tjedana) došlo je do porasta AST, ALT i bilirubina, te smanjenja vrijednosti albumina u serumu u svim intervencijskim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 9 i Slika 15). Nakon 14 tjedana pokusa jedina značajna razlika između skupina zabilježena je za vrijednosti bilirubina. U post-hoc analizi pokazalo se da su vrijednosti bilirubina u skupinama koje su dobivale BMP-7, BMP1-3Ab u dozi 15µg/kg, te obje skupine koje su dobivale kombiniranu terapiju bile značajno niže u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 9. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja (srednja vrijednost) jetrene lezije na početku (0 tjedana) i na kraju (nakon 14 tjedana) preventivskog dijela pokusa za sve uključene skupine. ANOVA-razlika između svih skupina (značajan $p < 0,05$); *značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu u post-hoc analizi.

	AST (IU/L)		ALT (IU/L)		Bilirubin (µmol/dL)		Albumin (g/dL)	
	0	14	0	14	0	14	0	14
Kontrola	86,00	233,00	54,50	201,75	0,33	2,31	5,35	3,63
BMP-7	78,75	184,38	50,13	184,13	0,38	2,12*	5,33	4,15
BMP-1-3 Ab 15µg/kg	91,50	190,63	55,88	175,75	0,36	2,15*	5,41	4,15
BMP-1-3 Ab 2.5µg/kg	87,38	204,25	51,63	176,13	0,34	2,32	5,23	3,85
BMP-1-3 Ab 2.5µg + BMP-7	89,00	176,63	52	172,63	0,40	2,17*	5,20	3,99
BMP-1-3 Ab 15µg + BMP-7	87,63	190,13	53,88	170,38	0,40	2,05*	5,09	4,05
p-vrijednost (ANOVA)	0,273	0,156	0,653	0,509	0,92	<0,001	0,471	0,1



Slika 15. Grafički prikaz dinamike biokemijskih parametara jetrene lezije po tjednima i prema skupinama preventijskog dijela pokusa.

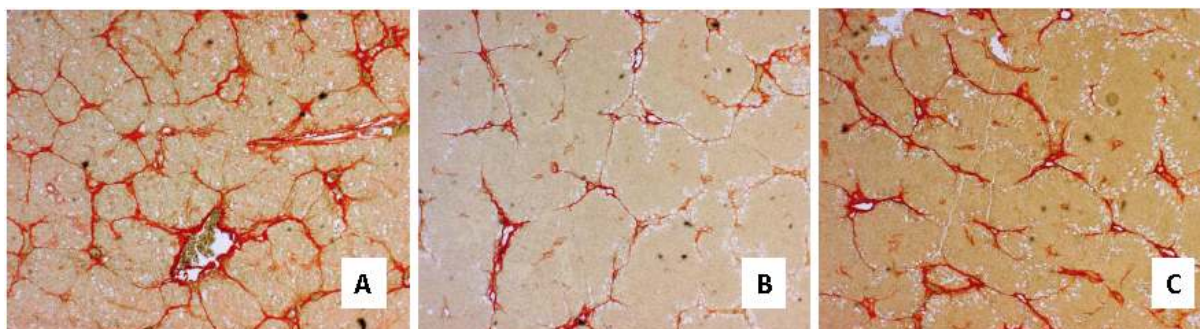
5.2.3. Utjecaj terapijskih protokola na razvoj jetrene fibroze

Patohistološki stadiji fibroze za kontrolnu i intervencijske skupine preventijskog dijela pokusa prikazani su u Tabl.10. Posebno su navedene vrijednosti za lijevi i za srednji režanj. Uočava se trend nešto višeg stadija fibroze u srednjem u odnosu na lijevi režanj za sve skupine, no razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$ za svaku skupinu; Fisher exact test). U odnosu na kontrolnu skupinu stadij fibroze za LR bio je statistički značajno niži u skupini koja je dobivala BMP-7 i kombinaciju BMP-7 sa BMP1-3 Ab u dozi od 15 µg/kg, a za DR značajna razlika uočena je između kontrolne skupine i skupine koja je dobivala kombinaciju BMP-7 sa BMP1-3 Ab u dozi od 15 µg/kg.

Tablica 10. Patohistološki stadij fibroze izražen kao medijan (raspon) za svaku skupinu i posebno za lijevi (LR) i srednji režanj (SR) jetre. St. fibr.=stadij fibroze po Nanji (0-4); K-W=Kruskal-Wallis test-razlike između skupina (značajan $p<0,05$); * $p<0,05$ u post-hoc analizi u odnosu na kontrolnu skupinu.

	Kontrola (CCl ₄)	BMP-7	BMP1-3Ab 15	BMP1-3Ab 2,5	Komb 2,5	Komb 15	P (K-W test)
Stadij fibroze SR medijan (raspon)	4 (3-4)	3,5 (2-4)	4 (2-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	3* (2-3)	0,0002
Stadij fibroze LR medijan (raspon)	4 (3-4)	3* (2-4)	3,5 (2-4)	4 (4-4)	4 (3-4)	3* (2-3)	0,0001

Karakteristični patohistološki nalazi prikazani su na Slici 16. Uočava se značajna razlika u arhitekturi jetrenog tkiva, te količini i debljini fibroznih septuma posebno u skupini liječenoj s BMP-7 u odnosu na kontrolnu skupinu.

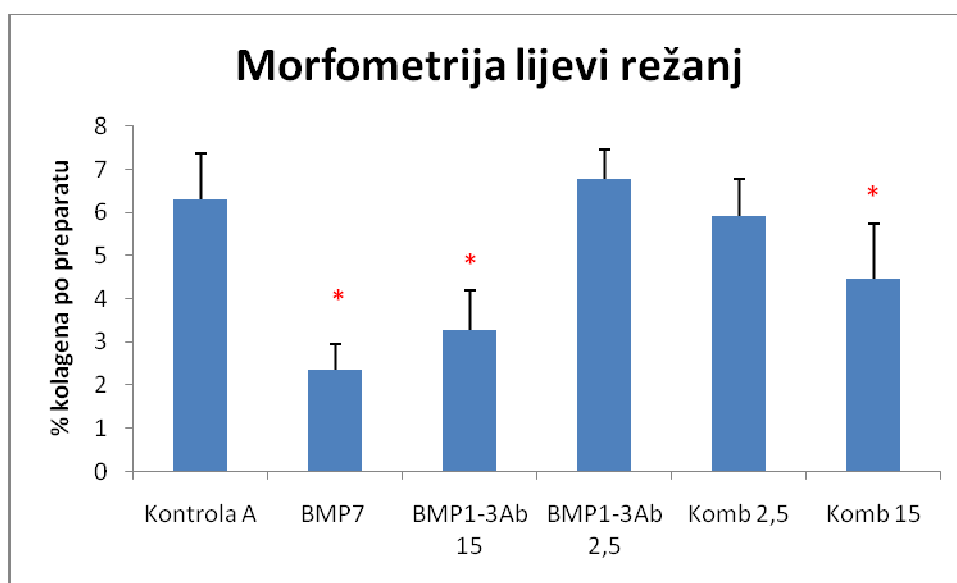


Slika 16. Patohistološki stadij fibroze, srednji režanj (Sirius-red, 4x). **A-** Kontrolna skupina (samo CCl₄)- stadij fibroze 4/4; **B-** Životinja iz skupine koja je dobivala CCl₄+ BMP-7- stadij fibroze 3/4; **C-** Životinja iz skupine koja je dobivala CCl₄+BMP 1-3 Ab u dozi 15µg/kg, stadij fibroze 3-4/4.

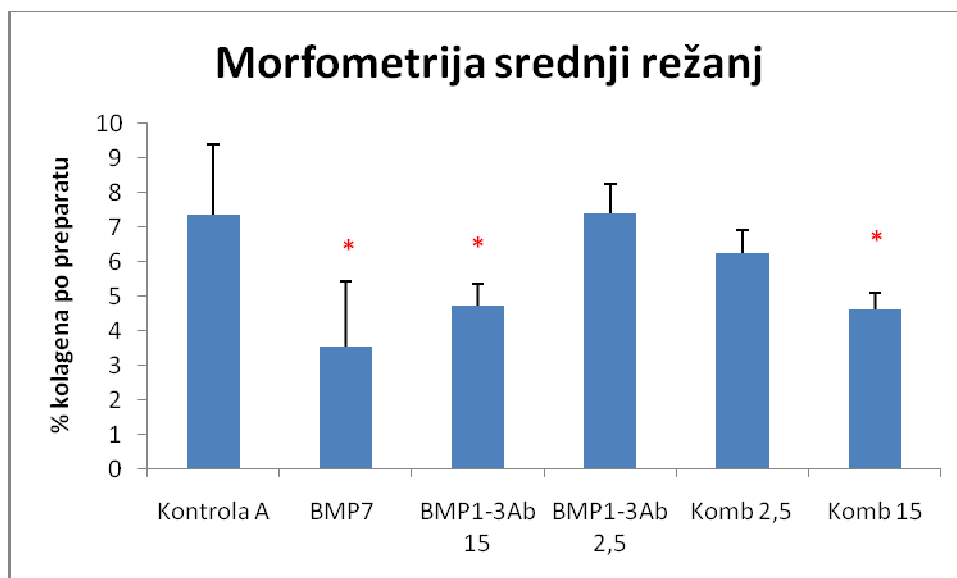
Analizirajući uznapredovalost fibroze morfometrijskom procjenom relativnog udjela kolagena na histološkom preparatu dobivene su značajne razlike između skupina i to uspoređujući posebno vrijednosti iz lijevog i posebno iz srednjeg reznja jetre (ANOVA $p<0,001$). U obje analize nađena je značajno niža količina kolagena u skupinama koje su dobivale BMP-7, protutijelo na BMP1-3 u dozi 15 µg/kg i kombinaciju BMP-7 i BMP1-3 Ab (15 µg/kg) u odnosu na kontrolnu skupinu. (Fisher LSD test; $p<0,05$) (Tablica 11; Slika 17 i 18).

Tablica 11. Morfometrijska analiza (% kolagena po preparatu±SD) po skupinama preventijskog pokusa A. ANOVA=razlika između skupina (značajan p<0,05); *post-hoc p<0,05 (Fisher LSD test) u odnosu na kontrolnu skupinu; t-test=razlika između režnjeva u istoj skupini (značajan p<0,05)

% kolagena	Kontrola (CCl ₄)	BMP-7	BMP 1-3Ab 15	BMP 1-3Ab 2,5	Komb 2,5	Komb 15	p (ANOVA)
LR srednja vrijednost	6,299	2,359*	3,267*	6,763	5,902	4,468*	<0,0001
±SD	1,057	0,591	0,932	0,679	0,858	1,267	
SR srednja vrijednost	7,344	3,524*	4,739*	7,392	6,248	4,610*	<0,0001
±SD	2,065	1,909	0,623	0,862	0,665	0,470	
p (t-test)	0,230	0,136	0,0024	0,129	0,383	0,774	



Slika 17. Morfometrijska analiza zastupljenosti fibroze (% kolagena po preparatu) po skupinama za lijevi režanj pokusa A. *p<0,001 u odnosu na kontrolu (ANOVA i Fisher LSD post-hoc test)



Slika 18. Morfometrijska analiza zastupljenosti fibroze (% kolagena po preparatu) po skupinama za srednji režanj pokusa A. * $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu (ANOVA i Fisher LSD post-hoc test)

Nije bilo značajne razlike u koncentraciji hidroksiprolina u tkivu jetre između skupina uključenih u preventivski pokus ($p = 0,555$; ANOVA) (Tablica 12)

Tablica 12. Koncentracija hidroksiprolina (HyPro) u tkivu jetre (srednja vrijednost \pm SD $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{g}$ tkiva) za sve skupine u preventivskom dijelu pokusa.

Konc. HyPro Pokus A	Kontrola	BMP-7	BMP 1-3Ab 15	BMP 1-3Ab 2,5	Komb 2,5	Komb 15	p (ANOVA)
Srednja Vrijednost	25,171	24,639	23,618	22,260	23,328	28,411	0,555
\pm SD	2,413	4,414	6,467	4,947	4,950	12,694	

5.2.4. Utjecaj terapijskih protokola na gensku i proteinsku ekspresiju koštanih morfogenetskih protina, njihovih inhibitora, faktora rasta i molekula izvanstaničnog matriksa

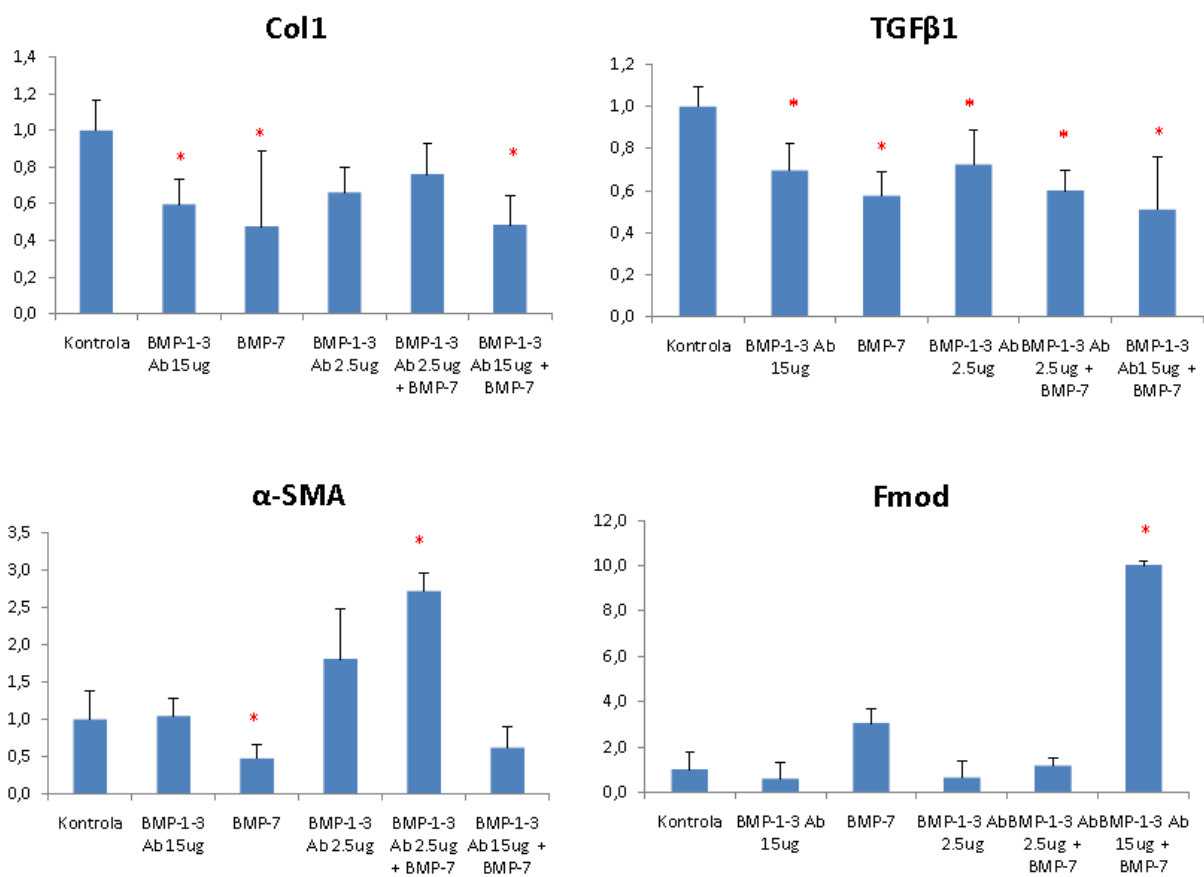
Rezultati analize genske ekspresije molekula od interesa za svaku od skupina uključenih u preventivski pokus A prikazani su u Tablici 13 i na Slikama 19 i 20.

Tablica 13. Rezultati qRT-PCR analize: relativna ekspresija gena u skupinama uključenim u preventijski dio pokusa. Vrijednosti su izražene kao broj puta promjene ekspresije \pm SD u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlike u ekspresiji svakog od gena između skupina testirane su ANOVA testom uz značajnost za $p < 0,05$.

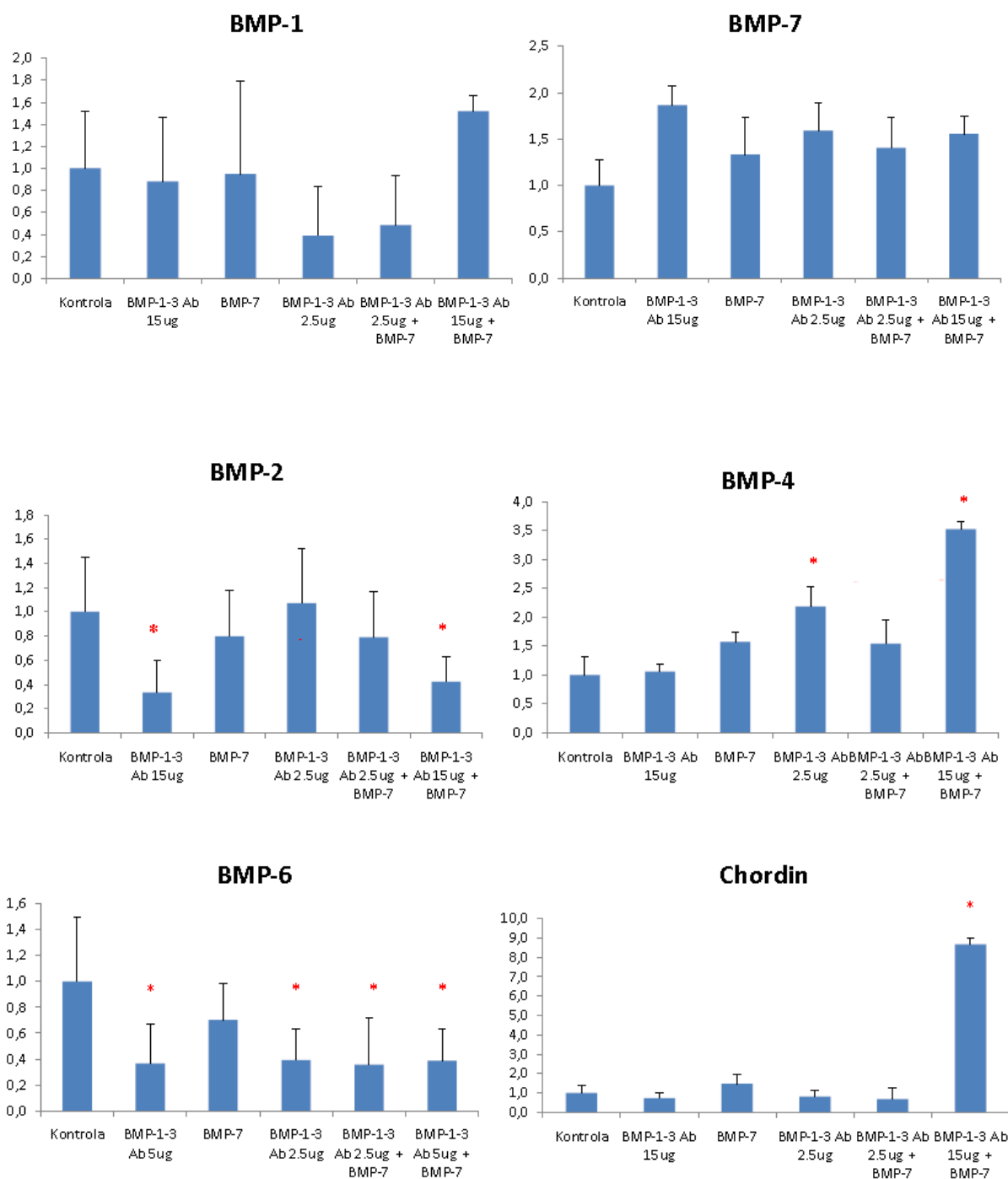
Pokus A	Relativna ekspresija gena \pm SD				
	<i>Colla1</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>αSma</i>	<i>Fmod</i>	<i>Chordin</i>
Kontrola	1	1	1	1	1
	0,467	0,264	1,091	2,147	1,05
BMP1-3 Ab 15 μ g	0,596	0,696	1,047	0,592	0,732
	0,392	0,365	0,689	2,095	0,845
BMP-7	0,475	0,574	0,478	3,053	1,473
	1,176	0,330	0,507	1,817	1,287
BMP1-3Ab 2.5 μ g	0,661	0,724	1,809	0,651	0,815
	0,392	0,462	1,908	1,981	0,974
BMP1-3Ab 2.5 μ g + BMP-7	0,761	0,599	2,718	1,169	0,682
	0,482	0,273	0,696	1,047	1,616
BMP1-3Ab 15 μ g + BMP-7	0,485	0,509	0,621	10,021	8,671
	0,452	0,718	0,798	0,469	0,973
ANOVA	0,011	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Relativna ekspresija gena \pm SD				
	<i>Bmp-1</i>	<i>Bmp-2</i>	<i>Bmp-4</i>	<i>Bmp-6</i>	<i>Bmp-7</i>
Kontrola	1	1	1	1	1
	1,481	1,27	0,891	1,398	0,799
BMP1-3 Ab 15 μ g	0,882	0,334	1,058	0,366	1,866
	1,651	0,756	0,387	0,857	0,584
BMP-7	0,950	0,798	1,576	0,703	1,331
	2,399	1,063	0,461	0,801	1,155
BMP1-3Ab 2.5 μ g	0,390	1,073	2,187	0,391	1,591
	1,270	1,280	0,966	0,692	0,837
BMP1-3Ab 2.5 μ g + BMP-7	0,485	0,789	1,545	0,358	1,403
	1,285	1,081	1,185	1,033	0,921
BMP1-3Ab 15 μ g + BMP-7	1,521	0,421	3,525	0,389	1,554
	0,391	0,594	0,356	0,698	0,545
ANOVA	0,134	0,01	<0,001	0,011	0,387

Dobivena je značajna razlika između skupina u genskoj ekspresiji molekula *Colla1*, *TGF β 1*, *α SMA*, *Fibromodulina*, *Chordina*, *BMP-2*, *BMP-4* i *BMP-6*, bez značajne razlike među skupinama u ekspresiji gena za *BMP1-3* i *BMP-7*. Do značajnog smanjenja ekspresije gena *Colla1* došlo je u skupinama koje su dobivale BMP-7 ($p=0,001$; post hoc test LSD), BMP1-3 Ab 15 μ g/kg ($p=0,022$) i kombiniranu terapiju BMP-7 i BMP1-3 Ab15 μ g/kg ($p=0,002$). Kod svih intervencijskih skupina došlo je do značajnog smanjenja ekspresije gena za *TGF β 1* s tim da je ono bilo najznačajnije za kombiniranu terapiju BMP-7 i BMP1-3 Ab 15 μ g/kg ($p < 0,001$). Smanjenje ekspresije gena za *α SMA* graničnog

značaja ($p=0,05$) uočeno je u grupi koja je dobivala BMP-7, a značajan porast zabilježen je u grupi koja je dobivala kombiniranu terapiju BMP-7 i BMP1-3 Ab 2,5 ug/kg ($p=0,009$). U odnosu na kontrolnu skupinu došlo je do značajnog povećanja ekspresije gena za *fibromodulin* jedino u skupini liječenoj kombinacijom BMP-7 i BMP1-3 Ab u dozi 15ug/kg ($p<0,001$) dok za druge intervencijske skupine nije bilo značajne razlike. Nije bilo značajne razlike između skupina u ekspresiji gena za *BMP1-3* i gena za *BMP-7*. Značajno smanjenje ekspresije gena za *BMP-2* zabilježeno je u skupini koja je dobivala BMP1-3Ab 15 μ g/kg ($p=0,004$) i skupini koja je dobivala kombinaciju BMP-7 + BMP1-3 Ab 15 μ g/kg u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,021$). Značajan porast ekspresije gena za *BMP-4* uočen je u skupini koja je dobivala BMP1-3 Ab u dozi 2,5 μ g/kg ($p=0,006$) i kombiniranu terapiju s BMP1-3 Ab u dozi 15 μ g/kg ($p<0,001$). U odnosu na kontrolnu skupinu, došlo je do značajnog smanjenja ekspresije gena za *BMP-6* u svim intervencijskim skupinama ($p<0,05$) osim onoj koja je dobivala BMP-7 ($p=0,288$). Ekspresija gena za *Chordin* značajno se povećala u skupini koja je dobivala kombiniranu terapiju s BMP1-3 Ab u dozi 15 ug/kg ($p<0,001$), dok za ostale skupine nije bilo značajne razlike prema kontroli.



Slika 19. Grafički prikaz relativne ekspresije gena za *Colla1*, *TGFβ1*, *α-SMA* i *fibromodulin* u intervencijskim u odnosu na kontrolnu skupinu preventijskog dijela pokusa. Rezultati su izraženi kao broj puta promjene ekspresije u odnosu na ekspresiju istog gena u kontrolnoj skupini (* $p<0,05$ u usporedbi s kontrolom; Fisher LSD test).



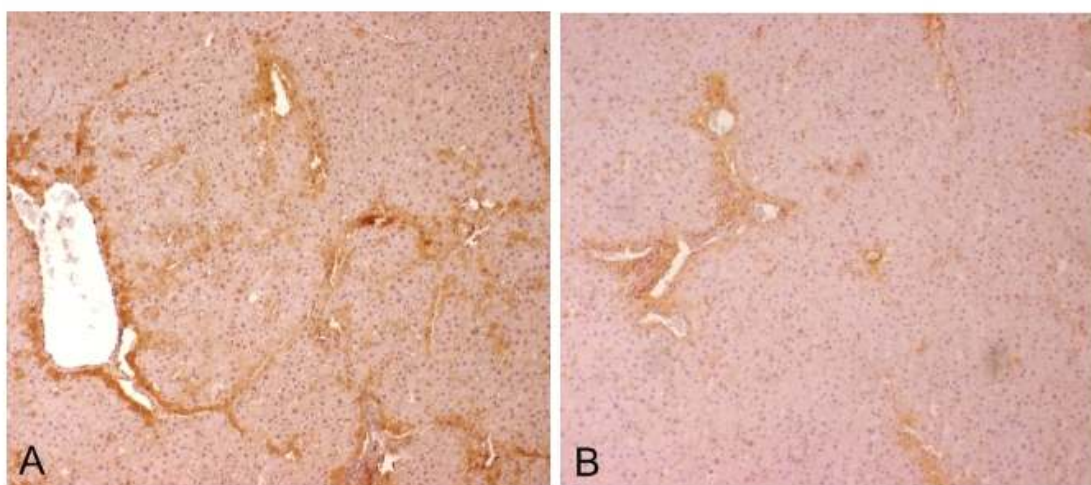
Slika 20. Grafički prikaz relativne ekspresije gena *Bmp-1*, *Bmp-7*, *Bmp-2*, *Bmp-4*, *Bmp-6* i *Chordin* u intervencijskim u odnosu na kontrolnu skupinu preventivnog dijela pokusa. Rezultati su izraženi kao broj puta promjene ekspresije u odnosu na ekspresiju istog gena u kontrolnoj skupini. (* $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom; Fisher LSD test).

Imunohistokemijskom analizom nađena je značajna razlika u intenzitetu obojenosti preparata na BMP1-3 protein među skupinama životinja uključenih u preventivski pokus ($p=0,0052$; Kruskal-Wallis test) (Tablica 14).

Tablica 14. Rezultati imunohistokemijske analize (medijan i raspon) po skupinama. Intenzitet bojanja procenjen semikvantitativno na skali od 0-3. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallisovim (KW) testom.

Imunohistokemija protein	Kontrola	BMP-7	BMP1-3 Ab 15 μ g	BMP1-3 Ab 2,5 μ g	Komb 2,5 μ g	Komb 15 μ g	p (KW)
BMP 1-3	0,5 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)	0,0052
BMP-7	0,5 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0	0	0	0,02
BMP-6	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0	0	0	0,111

U post-hoc analizi nije bilo razlike između bilo koje od intervencijskih u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, postojala je značajna razlika između dvije skupine koje su dobivale BMP1-3 Ab u niskoj (2,5 μ g/kg) i visokoj (15 μ g/kg) dozi; između skupine koja je dobivala BMP-7 i obje skupine koje su dobivale kombiniranu terapiju; između obje skupine koje su dobivale kombiniranu terapiju prema skupinama koje su dobivale samo BMP1-3 ab u dozi 2,5 μ g/kg ($p<0,05$ za sve usporedbe).



Slika 21. Imunohistokemija (BMP1-3 protutijelo). A-životinja tretirana s kombinacijom BMP-7 i BMP1-3 Ab u dozi 15 μ g/kg. B-životinja tretirana s BMP1-3 Ab 2,5 μ g/kg.

Iako je nađena značajna razlika između skupina u intenzitetu obojenosti preparata na BMP-7 protein ($p=0,02$; Kruskal-Wallis test), u post-hoc analizi ne dobivaju se značajne razlike među skupinama. Tek usporedbom kontrolne sa svim ostalim skupinama zajedno dobiva se značajna razlika ($p=0,004$ Fisher exact). Nije bilo razlike između skupina u odnosu na intenzitet obojenosti preparata BMP-6 protutijelom ($p=0,111$ Kruskal-Wallis).

5.3. Analiza učinkovitosti primjene BMP-7 i/ili BMP 1-3 protutijela u procesu regresije jetrene fibroze nakon prestanka djelovanja CCl₄

U ovaj dio pokusa kojega smo nazvali **Pokus B** ili terapijski pokus bile su uključene 32 životinje koje su prethodno 14 tjedana dobivale 10% CCl₄ i.p. 2x tjedno, a nakon toga slijedeća 4 tjedna nisu dobivale CCl₄. Nakon prvih 14 tjedana životinje su randomizirane u 4 skupine po 8 životinja pri čemu jedna skupina dalje nije dobivala nikakvu terapiju, te je služila kao negativna kontrola ovog dijela pokusa (**Kontrola B**), druga skupina dobivala je BMP-7 (**skupina BMP7**), treća je dobivala BMP1-3 Ab 2,5µg/kg (**skupina BMP1-3Ab 2,5**), a četvrta skupina kombinaciju BMP-7 i BMP 1-3 Ab 2,5µg/kg (**skupina Komb 2,5**).

5.3.1 Preživljenje životinja

Sve životinje u svim skupinama preživjele su cijelo vrijeme trajanja pokusa.

5.3.2. Utjecaj terapijskih protokola na biokemijske parametre jetrene lezije

Nije bilo značajne razlike između skupina životinja u vrijednostima biokemijskih pokazatelja jetrene lezije (AST, ALT, bilirubin i albumin) na početku pokusa (prije početka primjene nekog od intervencijskih modaliteta) i na kraju terapijskog dijela pokusa (Tabl.15).

Pokus B	AST(IU/L)		ALT (IU/L)		Bil (µmoL/dL)		Albumin (g/dL)	
	14	18	14	18	14	18	14	18
Tjedana	14	18	14	18	14	18	14	18
Kontrola	244,75	237,13	196,63	196,13	2,13	2,23	3,90	3,76
BMP1-3Ab 2,5µg	225,75	235,25	188,25	228,00	2,05	2,19	3,98	3,90
BMP-7	217,13	220,75	189,88	193,25	2,01	2,15	3,61	3,76
Komb 2,5 µg	229,88	225,5	199,88	216,38	1,99	2,08	3,93	3,86
p (ANOVA)	0,243	0,621	0,65	0,241	0,50	0,86	0,73	0,86

Tablica 15. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja (srednja vrijednost) jetrene lezije nakon 14 tjedana aplikacije CCl₄ prije započinjanja nekog od intervencijskih modaliteta i vrijednosti na kraju pokusa (nakon 18 tjedana ukupnog trajanja pokusa: 14 tjedana aplikacija CCl₄ + 4 tjedna intervencija) za sve uključene skupine. Razlike u vrijednostima pojedinog biokemijskog pokazatelja između skupina analizirane su ANOVA testom (značajnom se smatrala razlika za p<0,05).

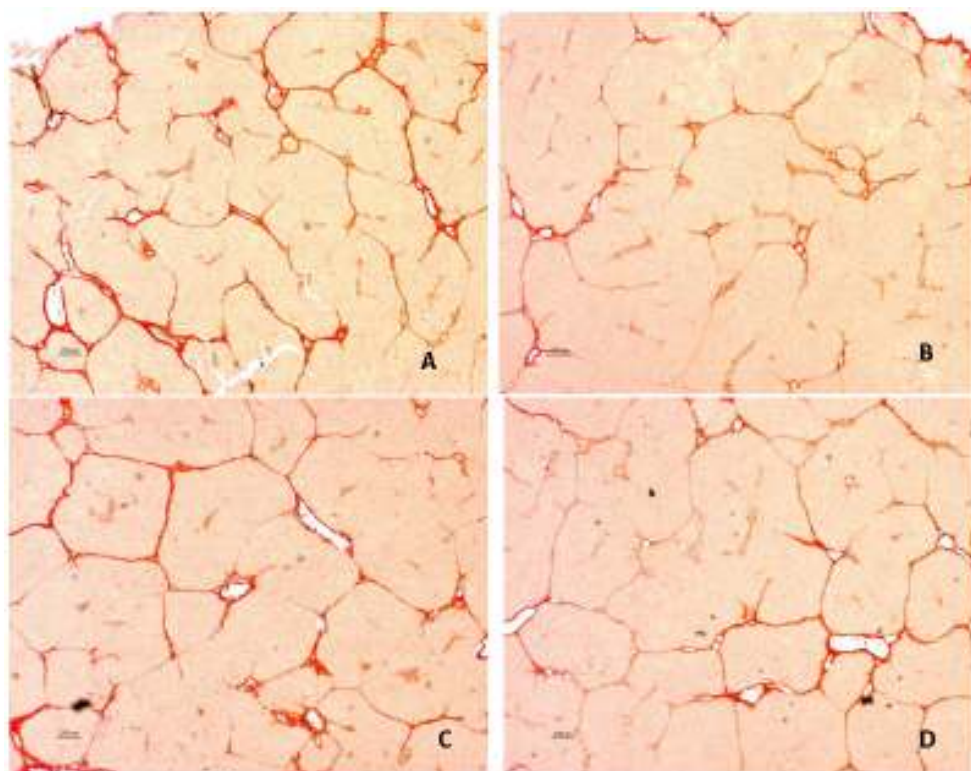
5.3.3. Utjecaj terapijskih protokola na zastupljenost fibroze u jetri

Patohistološki stadiji fibroze za kontrolnu i intervencijske skupine terapijskog dijela pokusa prikazani su u Tablici 16. Posebno su navedene vrijednosti za lijevi (LR) i za srednji režanj (SR). Nije bilo razlike u prosječnim vrijednostima stadija fibroze izraženog kao medijan između skupina uključenih u pokus B i to za lijevi i za srednji režanj jetre (Kruskal-Wallis $p > 0,05$ za sve komparacije). Također nije bilo razlike u prosječnom stadiju fibroze između lijevog i srednjeg reznja jetre unutar iste skupine životinja ($p > 0,05$ za svaku skupinu; Fisher exact test).

Tablica 16. Patohistološki stadij fibroze po Nanji (0-4) izražen kao medijan (raspon) za svaku skupinu i posebno za lijevi (LR) i srednji režanj (SR) jetre. p-vrijednost: Kruskal-Wallis test.

Pokus B (PHD)	Kontrola	BMP-7	BMP1-3Ab 2,5	Komb 2,5	p-vrijednost
Stadij fibroze SR medijan (raspon)	4	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0,785
Stadij fibroze LR medijan (raspon)	4	4 (3-4)	4 (3-4)	4 (3-4)	0,497

Karakteristični patohistološki nalazi jetrene fibroze za životinje uključene u terapijski dio pokusa prikazane su na Slici 22. Kod većine životinja u svim skupinama histološki je utvrđen 4/4 po Nanji (ciroza), iako su se unutar tako definiranog stadija 4 mogle uočiti razlike u smislu različite debljine vezivnih septuma, te broja jetrenih reznjica koji su bili potpuno zaokruženi vezivnom. Stoga je u slijedećem koraku napravljena morfometrijska analiza relativne zastupljenosti kolagena u svakoj skupini.



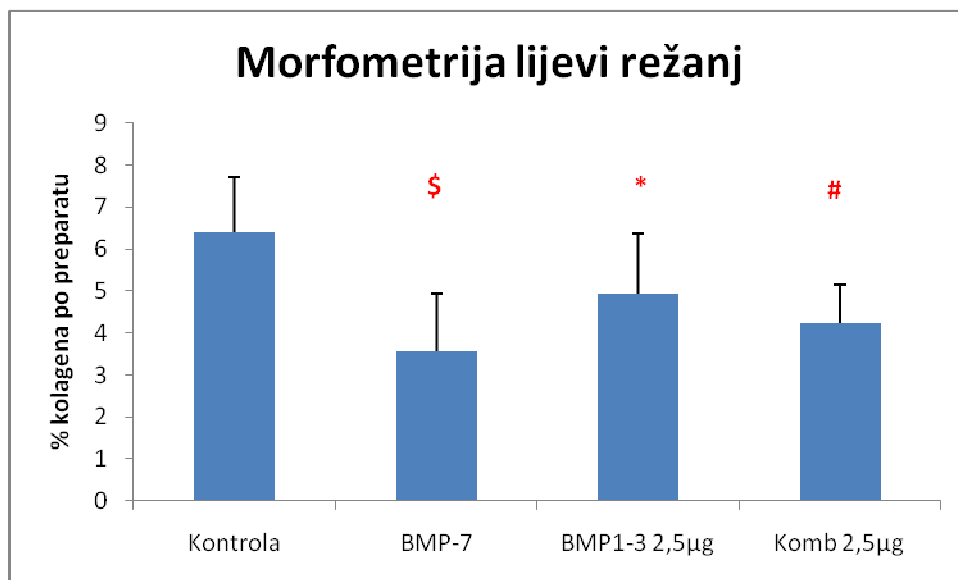
Slika 22. Patohistološke slike jetrene fibroze reprezentativnih životinja iz terapijskog dijela pokusa. **A-** kontrolna skupina **B;** **B-** životinja iz skupine koja je dobivala BMP-7; **C-** životinja iz skupine koja je dobivala BMP1-3 Ab 2,5 µg/kg; **D-** kombinirana th. BMP1-3 Ab 2,5 µg/kg+BMP7.

Analizirajući uznapređovalost fibroze morfolometrijskom procjenom relativnog udjela kolagena na histološkom preparatu dobivene su značajne razlike između skupina i to uspoređujući posebno vrijednosti iz lijevog ($p=0,001$; ANOVA) i posebno iz srednjeg režnja jetre ($p<0,001$)(Tablica 17).

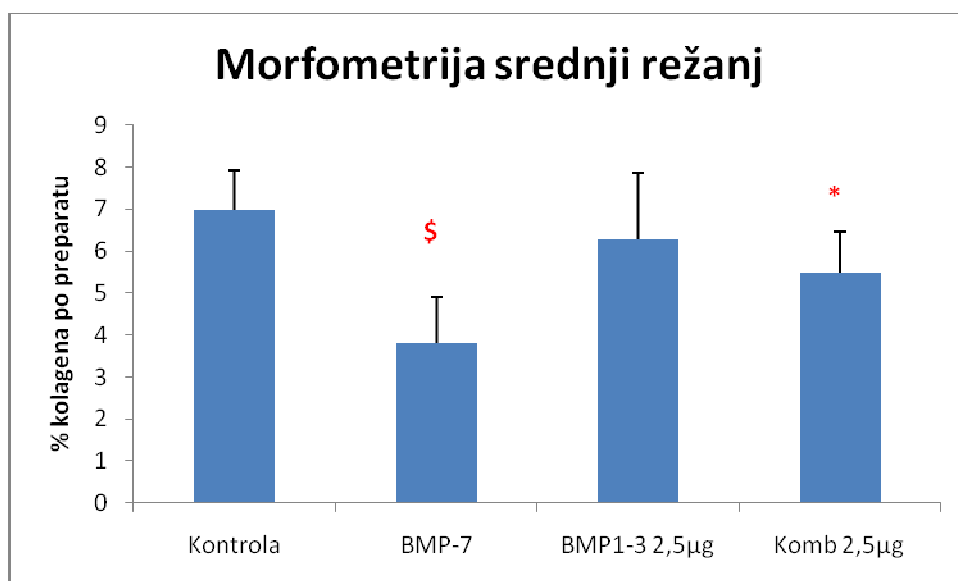
Tablica 17. Morfolometrijska analiza po skupinama pokusa B i razlike u zastupljenosti kolagena između režnjeva. * $p<0,05$ u odnosu na kontrolu (Fisher LSD test)

% kolagena	Kontrola	BMP-7	BMP1-3Ab 2,5µg	Komb 2,5µg	P (ANOVA)
LR srednja vrijednost	6,393	3,564*	4,930*	4,229*	0,001
±SD	1,311	1,361	1,441	0,931	
SR srednja vrijednost	6,971	3,800*	6,288	5,479*	<0,001
±SD	0,963	1,104	1,562	0,980	
p (t-test)	0,333	0,709	0,092	0,020	

U post-hoc analizi (Fisher LSD test) za lijevi režanj nađena je značajno niža količina kolagena u skupinama koje su dobivale BMP-7 ($p<0,001$), protutijelo na BMP1-3 u dozi 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0,03$) i kombinaciju BMP-7 i BMP1-3 Ab u dozi 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0,002$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 23). Značajno niža količina kolagena u srednjem režnju nađena je u skupinama koje su dobivale BMP-7 ($p<0,001$) i kombiniranu terapiju BMP-7 + BMP1-3Ab u dozi 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0,017$) (Slika 24). Usporedbom količine kolagena između LR i SR značajna razlika (kolagen SR>LR) nađena je jedino u skupini koja je dobivala kombiniranu th. BMP1-3 Ab+BMP-7 ($p=0,02$). (Tablica 17)



Slika 23. Morfometrijska analiza po skupinama za lijevi režanj pokusa B. * $p<0,05$; # $p<0,005$; \$ $p<0,001$ (ANOVA i Fisher LSD post-hoc test).



Slika 24. Morfometrijska analiza po skupinama za srednji režanj pokusa B. * $p<0,05$; \$ $p<0,001$ (ANOVA i Fisher LSD post-hoc test).

Nije bilo značajne razlike u koncentraciji hidroksiprolina u tkivu jetre između skupina uključenih u terapijski dio pokusa ($p=0,166$; ANOVA) (Tablica 18)

Tablica 18. Koncentracija hidroksiprolina (Konc. HyPro) u tkivu jetre (srednja vrijednost \pm SD $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{g}$ tkiva) za sve skupine u terapijskom dijelu pokusa. Razlike među skupinama analizirane su ANOVA testom.

Konc. HyPro Pokus B	Kontrola	BMP-7	BMP 1-3Ab 2,5	Komb 2,5	p (ANOVA)
Srednja vrijednost	22,936	28,028	24,454	17,835	0,166
\pm SD	15,234	5,955	3,090	6,118	

5.2.4. Utjecaj terapijskih protokola na gensku i proteinsku ekspresiju koštanih morfogenetskih protina, njihovih inhibitora, faktora rasta i molekula izvanstaničnog matriksa

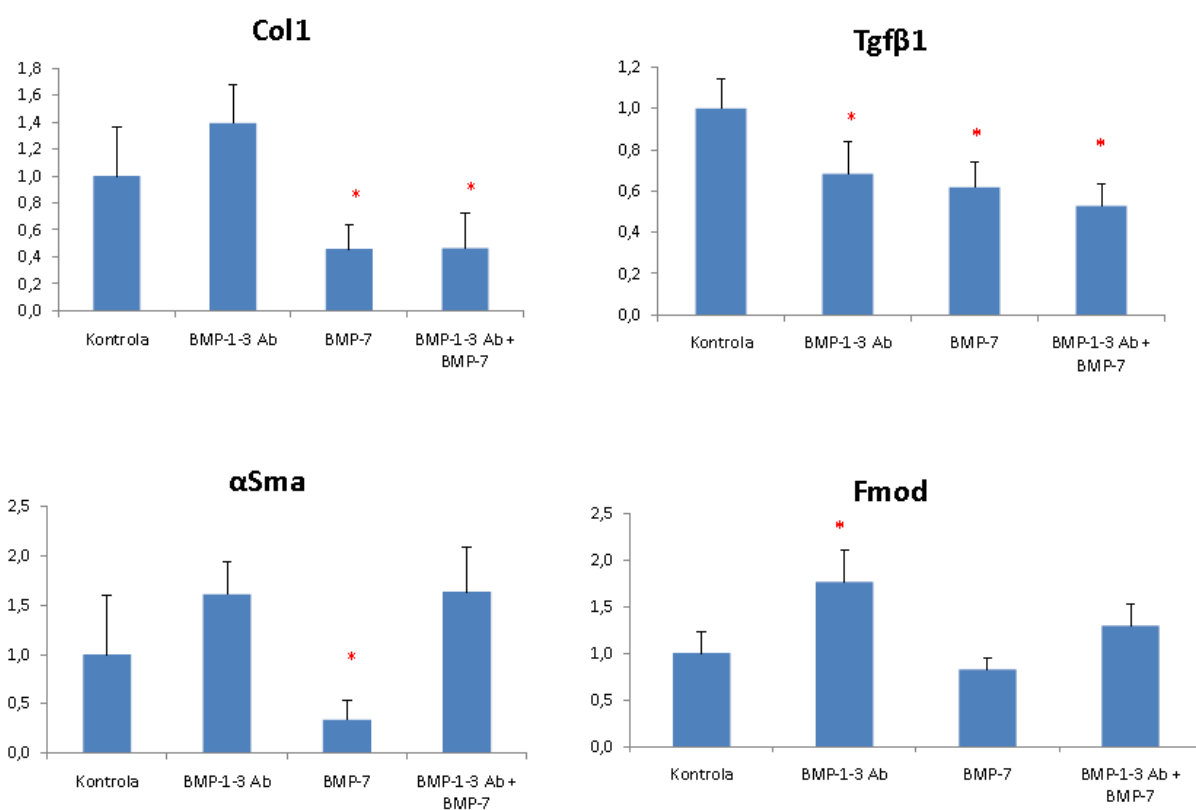
Rezultati analize genske ekspresije molekula od interesa za svaku od skupina uključenih u terapijski dio pokusa prikazani su u Tablici 19 i na Slikama 25 i 26.

Tablica 19. Rezultati qRT-PCR analize: relativna ekspresija gena u skupinama uključenim u terapijski dio pokusa. Vrijednosti su izražene kao broj puta promjene ekspresije \pm SD u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlike u ekspresiji svakog od gena između skupina testirane su ANOVA testom uz značajnost za $p < 0,05$.

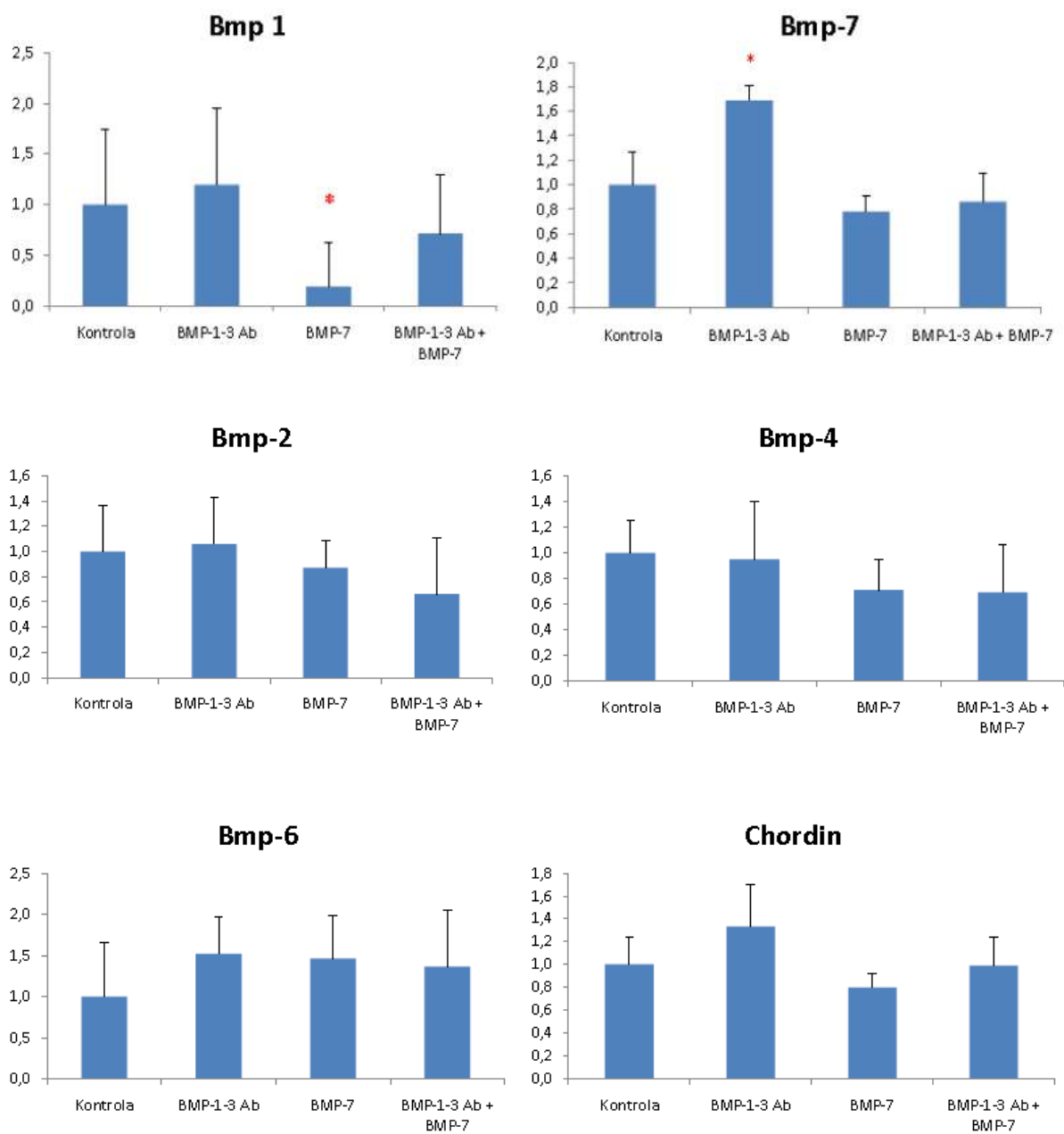
	Relativna ekspresija gena \pm SD				
Pokus B	<i>Coll1a1</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>aSma</i>	<i>Fmod</i>	<i>Chordin</i>
Kontrola	1 1,018	1 0,401	1 1,678	1 0,637	1 0,667
BMP1-3 Ab 2,5 μ g	1,390 0,796	0,684 0,442	1,608 0,921	1,762 0,988	1,331 1,028
BMP-7	0,457 0,520	0,618 0,346	0,338 0,551	0,822 0,360	0,798 0,329
BMP1-3Ab 2,5 μ g + BMP-7	0,464 0,733	0,528 0,314	1,636 1,269	1,296 0,657	0,988 0,724
ANOVA	<0,001	<0,001	0,002	0,022	0,27
	Relativna ekspresija gena \pm SD				
	<i>Bmp-1</i>	<i>Bmp-2</i>	<i>Bmp-4</i>	<i>Bmp-6</i>	<i>Bmp-7</i>
Kontrola	1 2,111	1 1,026	1 0,709	1 1,878	1 0,764
BMP1-3 Ab 2,5 μ g	1,195 2,128	1,060 1,036	0,949 1,270	1,521 1,245	1,689 0,350
BMP-7	0,187 1,252	0,872 0,615	0,709 0,683	1,462 1,483	0,780 0,383
BMP1-3Ab 2,5 μ g + BMP-7	0,713 1,642	0,664 1,244	0,691 1,051	1,365 1,927	0,861 0,652
ANOVA	0,027	0,552	0,579	0,882	0,002

Uočava se značajno smanjena ekspresija gena za *Coll1a1* u skupinama koje su dobivale BMP-7 ($p=0,008$) odnosno kombinaciju BMP-7 i BMP1-3 Ab (2,5 μ g/kg) ($p=0,009$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Ekspresija gena za *TGF β 1* bila je značajno snižena u sve 3 intervencijske skupine u odnosu

na kontrolu (za BMP-7 $p=0,001$; za BMP1-3 Ab $p=0,007$ i za kombiniranu th. BMP-7+BMP1-3 Ab $p<0,001$). Značajno sniženje ekspresije gena za αSMA zabilježeno je jedino u skupini koja je dobivala BMP-7 ($p=0,013$). Zabilježena je značajno viša ekspresija gena za *fibromodulin* u skupini koja je dobivala BMP1-3 Ab odnosu na kontrolu ($p=0,026$) dok kod druge dvije intervencijske skupine nije bilo razlike prema kontrolnoj. Uočena je značajno snižena ekspresija gena za *BMP-1* u odnosu na kontrolu u skupini koja je dobivala BMP-7 ($p=0,013$). U skupini koja je dobivala BMP1-3 Ab zabilježena je značajno povećana ekspresija gena za *BMP-7* ($p=0,012$). Za druge gene navedene u tablici (*Chordin*, *BMP-2*, *BMP-4* i *BMP-6*) nije bilo razlike u ekspresiji za bilo koji intervencijski modalitet u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 25. Grafički prikaz relativne ekspresije gena za *Colla1*, *Tgfβ1*, *α-Sma* i *fibromodulina* u intervencijskim u odnosu na kontrolnu skupinu terapijskog dijela pokusa. Rezultati su izraženi kao broj puta promjene ekspresije u odnosu na ekspresiju istog gena u kontrolnoj skupini (* $p<0,05$ u usporedbi s kontrolom; Fisher LSD test).



Slika 26. Grafički prikaz relativne ekspresije gena Bmp-1, Bmp-7, Bmp-2, Bmp-4, Bmp-6 i Chordin u intervencijskim u odnosu na kontrolnu skupinu terapijskog dijela pokusa. Rezultati su izraženi kao broj puta promjene ekspresije u odnosu na ekspresiju istog gena u kontrolnoj skupini. (* $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom; Fisher LSD test).

Imunohistokemijskom analizom nije nađena značajna razlika u intenzitetu obojenosti preparata na BMP1-3 ($p=0,195$; Kruskal-Wallis), BMP-6 ($p=0,649$) ni BMP-7 ($p=0,905$) protein među skupinama životinja uključenih u terapijski dio pokusa (Tablica 20).

Tablica 20. Rezultati imunohistokemijske analize (medijan i raspon) po skupinama. Intenzitet bojanja procenjen semikvantitativno na skali od 0-3. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallisovim (K-W) testom.

Imunohistokemija Protein	Kontrola	BMP-7	BMP1-3 Ab 2,5μ	Komb 2,5μg	p (K-W)
BMP 1-3	1 (0-1)	1(0-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	0,195
BMP-7	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,649
BMP-6	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,905

6. RASPRAVA

Ovo istraživanje imalo je 3 specifična cilja. Prvi cilj bio je istražiti ulogu koštanih morfogogenetskih proteina uključivo i BMP-1 u procesu razvoja i potencijalne regresije jetrene fibroze na štakorskom modelu toksične lezije jetre. U svrhu izazivanja toksične lezije i fibroze jetre u ovom istraživanju korišten je CCl_4 putem intraperitonealne aplikacije. Druga dva cilja bila su istražiti može li se primjenom specifičnih morfogenata (u ovom slučaju BMP-7), protutijela na BMP 1-3 ili njihovom kombinacijom utjecati na usporavanje razvoja jetrene fibroze (potencijalno preventijsko djelovanje) i na regresiju već razvijene fibroze/ciroze jetre nakon prestanka djelovanja toksina (potencijalno terapijsko djelovanje). Koštani morfogogenetski protein 7 izabran je na temelju dosadašnjih spoznaja prema kojima on ima regeneratorno djelovanje na hepatocyte, smanjuje razvoj fibroze u jetri i epitelno-mezenhimalnu transdiferencijaciju hepatocita (26, 193). Inhibicija djelovanja BMP 1-3 putem specifičnih protutijela izabrana je na temelju novijih spoznaja prema kojima BMP 1-3 izoforma predstavlja cirkulirajući oblik molekule BMP-1, te je imunohistokemijski dokazana njegova ekspresija u humanoj embrionalnoj jetri (221, 228). Kako BMP-1 molekula sudjeluje u procesu obrade prokolagena i nastanka zrelih molekula kolagena pretpostavili smo da bi ona mogla imati značajnu ulogu u razvoju jetrene fibroze, te da bi inhibicijom njenog cirkulirajućeg oblika (koji je ujedno i značajno zastupljen u jetri) mogli utjecati na razvoj i regresiju jetrene fibroze. Preliminarni podaci potvrđuju ovu ulogu BMP-1 molekule na eksperimentalnom modelu bubrežnog zatajenja gdje se primjenom BMP-1 proteina pogoršava, a primjenom protutijela na BMP-1 smanjuje fibroza u bubregu, što korespondira s relevantnim biokemijskim pokazateljima bubrežne funkcije i preživljenjem životinja (221).

Da bi se odgovorilo na postavljene ciljeve istraživanja ključno je bilo uspostaviti dobar eksperimentalni model jetrene fibroze. Dobar model podrazumijeva visoki postotak preživljenja životinja kod kojih se pri tom očekuje razvoj ciroze ili uznapredovale premoštavajuće fibroze jetre. Pregledom literature može se naći veliki broj radova u kojima je u tu svrhu primjenjen CCl_4 u različitim dozama, trajanju i načinu aplikacije (229, 230). Peroralna primjena zahtijeva gastričnu intubaciju štakora radi osiguranja unosa kontrolirane, točno određene količine toksina, a postupak se izvodi u anesteziji, radi čega je moguća aspiracija, te posljedične komplikacije. Kod subkutane primjene zabilježena je lokalna i sustavna upalna reakcija, te upalna infiltracija intersticija pluća što može interferirati s preživljenjem životinja i nejednolikim djelovanjem na jetru (244). Zbog toga je izabrana intraperitonealna primjena što je testirano u brojnim do sada objavljenim radovima. Intraperitonealnom primjenom CCl_4 u dozi 1mL/kg i koncentraciji 10, 30 i 50 % 1x tjedno, ili 50% 2x tjedno kroz 10 tjedana uočeno je najbolje preživljenje (80%) životinja tretiranih s 10% otopinom, dok je preživljenje u ostalim skupinama bilo redom kako su navedene 0%, 60% i 20% (229). Analizirajući

detaljno podatke u navedenoj studiji uočava se da nakon 10 tjedana primjene 10% otopine 1x tjedno dolazi do razvoja septalne fibroze, dok je kod primjene 50% otopine razvijena mikronodularna ciroza. U cilju postizanja što boljeg preživljavanja i razvoja uznapredovale fibroze, po mogućnosti rane ciroze, u našem istraživanju primjenili smo CCl₄ u dozi 1 mL/kg kao 10% otopinu s tim da smo povećali broj aplikacija na 2x tjedno i.p. i produžili vrijeme aplikacije na 14 tjedana. Ovim protokolom postignuto je preživljenje svih eksperimentalnih životinja, pri čemu je nakon 14 tjedana primjene CCl₄ kod svih 8 životinja koje su predstavljale pozitivnu kontrolu preventivskog dijela pokusa nađena uznapredovala septalna fibroza ili ciroza (kompletna ili inkompletna). Pri tom smo posebno analizirali stadij fibroze u srednjem (SR), a posebno u lijevom režnju (LR) jer se kod modela toksične lezije jetre može očekivati nejednolika distribucija fibroze u jetri, što je inače poznato i za neke difuzne bolesti jetre kod ljudi. Naime, prema rezultatima Yorozu K. i sur. (231) kod štakora koji su dobivali CCl₄ najizraženije fibrozne promjene vide se u srednjem i desnom režnju, dok su u lijevom režnju, lobus caudatusu i papilarnom nastavku manje izražene pri čemu zadnja 3 kompenzatorno hipertrofiraju.

U našem istraživanju analizom SR jetre kontrolne skupine životinja preventivskog dijela pokusa (Kontrola A) u 7/8 životinja nađena je ciroza (stadij 4/4 po Nanji), a u jedne životinje uznapredovala septalna fibroza (stadij 3/4 po Nanji), dok je u LR stadij 4/4 nađen u 6/8 životinja, a stadij 3/4 u 2 životinje. U kontrolnoj skupini terapijskog dijela pokusa (Pokus B) koja je prvih 14 tjedana dobivala CCl₄ po navedenom protokolu, a nakon toga se prestalo s njegovom primjenom i životinje slijedeća 4 tjedna do žrtvovanja nisu dobivale nikakvu terapiju (tj. promatrao se prirodni tijek bolesti i očekivana regresija fibroze) kod svih 8 životinja u oba režnja nađen je stadij fibroze 4/4. Usporedbom dobivenih rezultata patohistološkog stadija fibroze nije nađena značajna razlika u stadiju fibroze između lijevog i srednjeg režnja jetre unutar svake od tri skupine životinja koje su obuhvaćene ovom analizom (tj. zdrave životinje, životinje s cirozom (kontrola A) i životinje u fazi oporavka od toksičnog djelovanja (kontrola B)). Nije moguće decidirano tvrditi zašto u našem istraživanju nije, a u Yorozuovom jest uočena značajna razlika u stadiju fibroze između LR i SR jetre. Ipak, kao jedna od razlika između ova dva istraživanja uočava se činjenica da su u Yorozuovom istraživanju (231) korišteni Wistar štakori, te je kod svih primjenjena kombinacija fenobarbitona i CCl₄ koji je davan peroralnim putem, a cijeli pokus je trajao 11 tjedana, od čega je CCl₄ primjenjivan zadnjih 9 tjedana. Iako se i kod humanih studija mogu naći podaci o različitoj distribuciji fibroze u jetri, što je jedan od problema koji se nameće u razmatranju nalaza biopsije jetre (koja predstavlja uzorak od samo 1:50 000 ukupnog volumena jetre) kod nekih bolesti, primjerice kroničnog hepatitisa C pokazalo se da u pravilu razlika u stadiju fibroze između lijevog i desnog režnja ne iznosi više od 1 Ishakov stadij (Ishakova klasifikacija fibrozu kategorizira u stadije 0 (bez fibroze) do 6 (kompletna ciroza)) (98, 101-103). Može se pretpostaviti da tkivni uzorak i distribucija fibroze ovise o vrsti u kojoj se događa oštećenje jetre, te etiopatogenetskom mehanizmu razvoja bolesti (tj. modalitetima izazivanja oštećenja jetre i fibroze u eksperimentalnih životinja).

S obzirom da stadiji fibroze predstavljaju kategorijske vrijednosti, primjenom histoloških bodovnih sustava nije moguće posve ispravno kvantificirati količinu vezivnog tkiva u jetri. Pri tom su to manje precizni bodovni sustavi koji imaju manji broj kategorija (primjerice stadije fibroze razvrstavaju na skali od 0-4 naspram onih koji ih razvrstavaju u stadije 0-6) (97). Tako se primjerice pokazalo da stadij fibroze 4 ne znači da postoji dvostruko više vezivnog tkiva u jetri u odnosu na stadij 2, niti stadij 3 znači dvostruko manje fibroze u odnosu na stadij 6 (100). Da se radi o bitnim razlikama pokazalo se u studijama u kojima je dokazano da unutar istog stadija (primjerice ciroze- koja ovisno o bodovnom sustavu može biti označena kao stadij 4 ili 6; u svakom slučaju predstavlja krajnji stadij koji pojedini bodovni sustav poznaje) postoje značajne razlike u količini vezivnog tkiva što značajno korelira s kliničkim tijekom bolesti (121, 239). Primjerice, ukoliko jedna osoba ima „početnu“ cirozu s tankim fibroznim septima i manjom količinom veziva tada ona ima manju vjerojatnost razvoja dekompenzacije ciroze i ima niže vrijednosti portalnog tlaka u odnosu na drugu osobu koja također ima cirozu, ali s debljim septima i većom količinom veziva (23, 112, 239). Zbog toga smo prilikom analize učinka CCl₄ na razvoj fibroze i svih ostalih ciljeva ovog istraživanja zastupljenost, tj. količinu stvorenog vezivnog tkiva u jetri kvantificirali morfometrijski određujući relativni udio kolagena na svakom histološkom preparatu. Metodom Sirius-red oboji se samo kolagen na preparatu, te se izračunava obojena površina u odnosu na cijelu površinu preparata (121). Takvom analizom potvrđeni su rezultati patohistološke analize te je uočena značajno veća količina veziva kod obje grupe koje su dobivale CCl₄ (Kontrola A i B) u odnosu na negativnu kontrolu, a nije nađena značajna razlika u količini fibroze između LR i SR za sve tri ispitivane skupine životinja. Morfometrijska procjena količine fibroze posebno je korištena kasnije u finijoj analizi zastupljenosti fibroze između pojedinih intervencijskih skupina preventijskog i terapijskog dijela pokusa.

Kao treća metoda za procjenu količine umnoženog veziva korišteno je određivanje koncentracije hidroksiprolina u tkivu jetre, jer je hidroksiprolin aminokiselina koja je visokozastupljena u strukturi kolagena, te je njegova tkivna koncentracija u korelaciji s koncentracijom kolagena (240-242). Hidroksiprolin je određen iz ukupnog sadržaja homogeniziranog tkiva dijela lijevog i srednjeg režnja jetre, a ne za svaki režanj posebno. Kako se u prethodnim patohistološkim i morfometrijskim analizama pokazalo da nije bilo značajne razlike u zastupljenosti vezivnog tkiva između LR i SR smatramo da su dobiveni rezultati zajedničke analize homogenizata tkiva obaju režnjeva reprezentativni za cijelu jetru. Dobivena je značajna razlika u koncentraciji hidroksiprolina između zdravih životinja (negativna kontrola) i životinja izloženih djelovanju CCl₄ (Kontrola A i B), s tim da nije bilo razlike između zadnjih dviju skupina.

Sumarnom analizom rezultata ove tri metode za određivanje uznapredovalosti fibroze u jetri može se zaključiti da nakon 14 tjedana primjene CCl₄ kod svih životinja dolazi do razvoja ciroze ili uznapredovale septalne fibroze, pri čemu su sve životinje preživjele cijelo vrijeme trajanja pokusa. Nakon 4 tjedna od prestanka primjene CCl₄ ne dolazi do značajne spontane regresije fibroze.

Kod svih životinja u skupinama koje su dobivale CCl₄ (Kontrola A i B) nakon 14 tjedana došlo je do značajnog porasta biokemijskih pokazatelja jetrene lezije (AST, ALT, Bilirubin u serumu) u odnosu na negativnu kontrolu (tj. životinje koje su dobivale samo maslinovo ulje i.p.). U post-hoc analizi pokazalo se i da je srednja vrijednost Bilirubina nakon 14 tjedana primjene CCl₄ bila značajno manja kod kontrolnih životinja za Pokus B u odnosu na pozitivnu kontrolu pokusa A, za što se ne uočavaju jasni razlozi s obzirom da je CCl₄ u obje skupine primjenjivan po istom protokolu, te nije bilo značajne razlike u vrijednostima drugih biokemijskih pokazatelja između ove dvije skupine. Očekivano, kod CCl₄ tretiranih životinja došlo je do značajnog sniženja vrijednosti albumina u serumu što odražava smanjenu sintetsku funkciju jetre kao posljedicu ciroze.

U ovako postavljenom eksperimentalnom modelu analizirana je uloga koštanih morfogenetskih proteina i srodnih molekula u procesima razvoja jetrene fibroze, te potencijalne regresije fibroze nakon prestanka djelovanja toksičnog agensa. Za tu namjenu korištena je metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR) kojom se kvantificira genska ekspresija mjerenjem tkivne koncentracije mRNA dotičnog gena (236). Najprije smo analizirali razlike u genskoj ekspresiji između zdravih životinja (negativna kontrola) i životinja koje su kroz 14 tjedana dobivale CCl₄ i razvile uznapredovalu septalnu fibroz/cirozu (Kontrola A). Zatim smo analizirali razlike u genskoj ekspresiji između životinja u fazi oporavka nakon prestanka primjene CCl₄ (kontrola B) u odnosu na kontrolnu skupinu Pokusa A (Kontrola A). U životinja s fibrozom/cirozom na kraju Pokusa A uočena je značajno povećana ekspresija gena za kolagen (*Coll1A1*), što odražava povećano stvaranje kolagena tip 1 kao dominantno zastupljene molekule u vezivnom tkivu u procesu fibrogeneze u jetri (17, 22-24). Iako nešto povećana ekspresija gena za Fibromodulin nije bila značajno različita u odnosu na kontrolnu skupinu. Fibromodulin spada u skupinu proteoglikana i predstavlja jednu od molekula ECM-a značajnih za normalno odvijanje procesa fibrilogeneze kolagena (245). Dokazano je međutim i da Fibromodulin veže TGFβ1 u međustaničnom prostoru, onemogućavajući mu interakciju s njegovim staničnim receptorima, te na taj način zapravo djeluje inhibitorno na razvoj fibroze (246). U skupini životinja s fibrozom/cirozom nađena je značajno povećana ekspresija gena *Tgfb1* čiji je produkt jedan od ključnih medijatora fibrogeneze, što je očekivan rezultat sukladan dosadašnjim spoznajama o ulozi TGFβ1 u procesu fibrogeneze u jetri (17, 22, 23). Upravo je TGFβ1 najzastupljenija izoforma ovog proteina u zdravoj i fibrotičnoj štakorskoj jetri (63). Značajno je povećana ekspresija *αSma* kao biljega aktivacije HSC koje su glavi izvor stvaranja vezivnog tkiva u jetri (27).

Suprotni rezultati zabilježeni su kod životinja u fazi oporavka nakon prestanka primjene CCl₄ (Kontrola B), tj. u ovoj skupini došlo je do značajnog smanjenja ekspresije *Coll1A1* i *αSma* gena u odnosu na kontrolnu skupinu Pokusa A što ukazuje na zaustavljanje razvoja patološkog procesa fibrogeneze u jetri. Iako je u ovoj skupini zabilježeno i smanjenje ekspresije *Tgfb1* gena razlika u odnosu na Kontrolu A nije bila značajna. U fazi oporavka uočena je značajno povećana ekspresija gena za Fibromodulin i Chordin. Sukladno ranijim navodima moguće je da Fibromodulin u fazi

oporavka vezuje TGF β 1 koji se nalazi u međustaničnom prostoru onemogućavajući njegove profibrogene učinke. Prema nekim studijama TGF β 1 dovodi do povećanog stvaranja Fibromodulina koji bi onda mogao opisanim mehanizmom djelovati negativnom povratnom spregom u finoj regulaciji aktivnosti TGF β 1 (247). Međutim, u našem istraživanju jačine genske ekspresije ovih dviju molekula su obrnutog usmjerenja, tj. u fazi razvoja fibroze vidi se značajan porast *Tgfb1* uz nesignifikantan porast *Fmod* ekspresije, dok se u fazi oporavka nakon prestanka toksičnog djelovanja CCl₄ bilježi značajan porast *Fmod* i nesignifikantno smanjenje *Tgfb1* ekspresije. Isto tako obrnut smjer jačine genske ekspresije uočava se u odnosu *Fmod* i *Coll1A1* gena. Razloge ovakvim odnosima genske ekspresije nije moguće sagledati iz rezultata ovog istraživanja, s obzirom da nedostaju rezultati proteinske ekspresije ovih molekula u tkivu, dok bi za razumijevanje njihove uloge i međusobnih interakcija u procesu jetrene fibrogenoze trebalo provesti dodatne *in vivo*, a vjerojatno i *in vitro* eksperimente s primjenom ovih molekula i/ili njihovih inhibitora. Porast ekspresije Chordina u fazi oporavka moguće je u uzročnoj svezi s porastom ekspresije *Bmp2* i *Bmp4*, te možda predstavlja regulatorni mehanizam kojim se ograničava njihova pretjerana ekspresija i funkcionalni učinci (223).

Kako uloga koštanih morfogenetskih proteina u razvoju jetrene fibroze i regeneraciji jetre još uvijek nije do kraja razjašnjena, u ovom smo istraživanju pratili promjene genske ekspresije nekoliko članova BMP obitelji. Tijekom razvoja fibroze u jetri značajno je povećana ekspresija *Bmp7* gena, dok je značajno smanjena ekspresija samo *Bmp4* gena u odnosu na zdrave životinje. Nije bilo značajne razlike u ekspresiji *Bmp1*, *Bmp2*, *Bmp6* gena kao niti gena za Chordin koji predstavlja inhibitornu molekulu za BMP-2 i BMP-4. Uloga BMP-7 u jetri proučavana je u nekoliko studija na mišjem modelu i kod ljudi. Prema rezultatima ovih studija u miševa se BMP-7 ne stvara u jetri, ali postoje njegovi receptori na hepatocitima (26). BMP-7 se dominantno stvara u bubregu i kostima. Na mišjem modelu pokazano je kako se sustavnom primjenom rhBMP-7 ubrzava regeneracija jetre nakon parcijalne hepatektomije, a usporava u slučaju primjene specifičnih protutijela na BMP-7 (193). Također se pokazalo da sustavna primjena rhBMP-7 proteina značajno smanjuje razvoj jetrene fibroze uzrokovane toksičnim djelovanjem CCl₄ u miševa, a da se taj učinak barem dijelom objašnjava inhibicijom TGF β 1 posredovane EMT hepatocita (26). Nasuprot kod bolesnika s kroničnom bolesti jetre nađene su značajno povišene vrijednosti cirkulirajućeg BMP-7 u plazmi u odnosu na zdrave osobe, s tim da su najviše vrijednosti zabilježene u bolesnika s cirozom u Child C stadiju (206). Imunohistokemijskom analizom biopsijskog uzorka humane jetre nađena je povećana ekspresija BMP-7 proteina u bolesnoj jetri, pri čemu su hepatociti bili glavni izvor BMP-7. U *in vitro* dijelu pokusu transfekcijom humanih HSC adenovirusom koji kodira sintezu BMP-7 došlo do povećane proliferacije HSC, te ekspresije mRNA i proteina kolagena tip 1 i fibronektina što bi ukazivalo na profibrogeni učinak BMP-7. Postoje dakle proturječni rezultati o djelovanju BMP-7 u jetri, za sada bez jasnog objašnjenja za navedene razlike. U našoj studiji zabilježen je značajan porast ekspresije mRNA za BMP-7 kod štakora koji su razvili cirozu u odnosu na zdrave štakore. Imunohistokemijskom analizom

BMP-7 nije detektiran u zdravoj jetri, dok je u cirotičnoj jetri nađena blaga ekspresija, no razlika nije bila statistički značajna. Međutim, u fazi oporavka nakon 4 tjedna od prestanka davanja CCl₄ (Kontrola B) uočava se značajan pad ekspresije gena za BMP-7. Dakle, za vrijeme toksičnog djelovanja i razvoja fibroze dolazi do povećane ekspresije *Bmp7* gena, a nakon prestanka toksičnog djelovanja njegova se ekspresija smanjuje. Povećana genska ekspresija na kraju toksičnog djelovanja u funkcionalnom smislu može se protumačiti kao mehanizam koji posreduje razvoju jetrene fibroze, no i kao kompenzatorno povećanje ekspresije u cilju oponiranja štetnim učincima toksina na jetru. Kao što se pokazalo u daljnjoj analizi preventivskog i terapijskog dijela pokusa sustavnom primjenom rhBMP-7 u značajnoj mjeri smanjena je količina vezivnog tkiva u jetri i ekspresija gena za kolagen tipa 1, TGFβ1 i αSMA kao aktivacijskog biljega HSC. Iz toga se može zaključiti da povećana ekspresija *Bmp7* u cirozi predstavlja kompenzatorni odgovor na oštećenje jetre i da djelovanjem BMP-7 dolazi do smanjene aktivacije HSC, smanjene produkcije TGFβ1 kao jednog od glavnih medijatora fibrogeneze u jetri, te smanjene sinteze kolagena tipa 1.

U našem istraživanju uočava se značajno sniženje ekspresije *Bmp4* gena u životinja izloženih djelovanju CCl₄ (Kontrola A) u odnosu na negativnu kontrolu, dok sniženje ekspresije *Bmp2* nije bilo značajno. Suprotno tome, u fazi oporavka jetre nakon prestanka primjene CCl₄ uočili smo značajan porast ekspresije *Bmp2* i *Bmp4* gena u odnosu na kontrolnu skupinu Pokusa A. Iz ranijih studija poznato je da BMP-4 regulira proliferaciju i diferencijaciju jetrenog pupoljka u embrionalnom razvoju, kao i da se ekspresija BMP-4 pojačava u štakorskoj jetri nakon podvezivanja zajedničkog žučovoda, te da BMP-4 dovodi do aktivacije HSC u tom modelu jetrene lezije (179, 193, 202, 203). Ekspresija molekule BMP-2 izražena je u odrasloj zdravoj jetri i negativno utječe na proliferaciju hepatocita. Na štakorskom modelu uočeno je smanjenje njegove ekspresije nakon parcijalne hepatektomije što ukazuje da je takva supresija bitna radi osiguranja normalne proliferacije hepatocita. Također je dokazano da BMP-2 inhibira proliferaciju Huh7 stanica hepatoma (65). Naši rezultati sugeriraju da tijekom toksičnog djelovanja i fibrogeneze dolazi do smanjenja, a u fazi oporavka jetre do porasta ekspresije *Bmp2* i *Bmp4*, iz čega se vidi da je dinamika njihove ekspresije suprotnog predznaka u odnosu na dinamiku ekspresije *Bmp7*. Izgleda da se ekspresija *Bmp7* pojačava u tijeku razvoja jetrene lezije i fibrogeneze u cilju aktivnog suprostavljanja negativnim učincima toksičnog djelovanja CCl₄, dok se *Bmp2* i *Bmp4* aktiviraju nakon prestanka djelovanja etiopatogenetskog čimbenika i možda u toj fazi potiču regeneraciju jetre barem u štakorskom modelu jetrene lezije uzrokovane djelovanjem CCl₄. Očito postoje za sada donekle proturječni rezultati o ulozi BMP-2 i BMP-4 u jetri, te bi u cilju definiranja njihove uloge bilo potrebno napraviti istraživanja s primjenom rekombinantnih BMP-2 i BMP-4 proteina te na njih specifičnih protutijela na različitim modelima jetrene lezije *in vivo* i *in vitro*.

U ovom radu po prvi put analizirana je uloga BMP-1 u procesu fibrogeneze u jetri. Kod životinja koje su razvile cirozu kao posljedicu toksičnog djelovanja CCl₄ uočena je povećana

ekspresija *Bmp1* gena, no razlika nije bila značajna u odnosu na zdrave životinje. Međutim, u fazi oporavka (Kontrola B) došlo je do značajnog sniženja njegove ekspresije. Kao i za prethodno analizirane gene tako je i za *Bmp1* uočena suprotna dinamika genske ekspresije ovisno o promatranoj fazi evolucije jetrene lezije. Iako bi se u fazi aktivnog toksičnog djelovanja i razvoja fibroze mogao očekivati značajan porast ekspresije *Bmp1* to nije uočeno. Međutim, u fazi oporavka u kojoj se očekuje smanjenje/zaustavljanje procesa fibrogeneze, došlo je do značajnog smanjenja ekspresije *Bmp1* gena pokazujući paralelnu dinamiku kretanja s ekspresijom *Coll1A1* i *αSma* gena. Ova zadnja opservacija sukladna je biološkoj ulozi BMP-1 molekule kao metaloproteinaze koja ima značajnu ulogu u procesiranju nezrelog kolagena (213, 222). Prestankom djelovanja profibrogenog štetnog agensa smanjuje se aktivacija HSC i sinteza prokolagena, što vjerojatno negativnom povratnom spregom putem za sada nedovoljno poznatih mehanizama utječe na smanjenje ekspresije gena za BMP-1. Imunohistokemijskom analizom nije nađena značajna razlika u tkivnoj ekspresiji BMP1-3 izoforme proteina između zdravih životinja, životinja s cirozom i onih u fazi oporavka. Ovaj imunohistokemijski rezultat treba interpretirati s oprezom, budući da BMP 1-3 predstavlja samo jednu od poznatih 6 izoformi koje nastaju procesiranjem originalnog genskog transkripta mRNA za BMP-1, što je tkivno specifičan proces koji dovodi do stvaranja različitih izoformi BMP-1 proteina u različitim organima (220). U našem istraživanju analizirana je ekspresija BMP1-3 izoforme proteina u jetri temeljem pozitivnog imunohistokemijskog nalaza dobivenog na humanoj embrionalnoj jetri (221), kao i najnovijih spoznaja o tome da se BMP 1-3 nalazi u cirkulaciji radi čega se može pretpostaviti da upravo ova izoforma ima značajnu ulogu u homeostazi različitih tkiva i organa. Međutim, to nužno ne znači da je upravo ova izoforma značajno zastupljena u štakorskoj jetri, te u različitim fazama životnog vijeka kao i u različitim fazama odvijanja patološkog zbivanja u jetri.

U procesu razvoja jetrene lezije i fazi oporavka uočena je povećana ekspresija *Bmp6* gena, no ona nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolne skupine. Iz toga bi se dalo zaključiti kako BMP-6 nema značajnu ulogu u navedenom patofiziološkom procesu. Međutim, prema ranijim studijama ekspresija BMP-6 zabilježena je u štakorskoj jetri gdje ga produciraju HSC i Kupferove stanice, a u kulturi HSC uočena je njegova povećana ekspresija na poticaj TGF-β1, te je zaključeno da bi BMP-6 mogao imati ulogu u regeneraciji jetre. (204). Uloga BMP-6 posebno je istražena u hemokromatozi, gdje se njegovom primjenom kod BMP-6 knock-out miševa uočila povećana ekspresija hepcidina u jetri čime se smanjuje resorpcija željeza iz probavnog sustava (205). Kako je željezo jedan od faktora oksidativnog stresa i kako je poznato da u mnogim kroničnim bolestima jetre postoji povećana akumulacija željeza u jetri može se pretpostaviti da bi primjena BMP-6 proteina mogla smanjiti tkivno oštećenje smanjujući apsorpciju željeza i njegov dotok u jetru. Imunohistokemijskom analizom jačine ekspresijskog signala BMP-6 proteina u tkivu jetre također nije nađena značajna razlika između zdravih životinja, životinja s cirozom (Kontrola A) i životinja u fazi oporavka (Kontrola B).

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je analizirati učinke sustavne primjene BMP-7 proteina i protutijela na BMP1-3 na preživljenje životinja, biokemijske parametre jetrene lezije i razvoj fibroze u jetri. Temeljem naprijed citiranih studija postoje proturječni podaci o fiziologiji BMP-7 i njegovoj ulozi u kontekstu procesa fibrogeneze u jetri. Nije dovoljno proučena niti fiziološka uloga BMP-1 u jetri kao ni njegovo ponašanje tijekom razvoja jetrene lezije i fibrogeneze. U preventivskom dijelu pokusa (Pokus A) nije bilo razlike u preživljenju između kontrolne i intervencijskih skupina jer su sve životinje u svim skupinama preživjele do kraja pokusa. Nije uočen značajan učinak terapijskih modaliteta na serumske vrijednosti aminotransferaza i albumina, dok je bilirubin bio značajno niži u skupinama koje su dobivale BMP-7, BMP1-3Ab u dozi 15 μ g/kg i kombiniranu terapiju BMP-7 + BMP1-3Ab (obje koncentracije protutijela) u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$). Doze BMP1-3Ab koje su korištene u ovom istraživanju definirane su na temelju rezultata njihove primjene u štakorskom modelu bubrežnog zatajivanja gdje su bile učinkovite u korekciji pokazatelja bubrežne funkcije, poboljšanju preživljenja životinja, te redukciji fibroze u bubrezima. Sumarnom analizom podataka o zastupljenosti fibroze u jetri može se zaključiti da i BMP-7 i BMP1-3Ab u višoj dozi (15 μ g/kg), te njihova kombinacija pokazuju antifibrozo djelovanje. Pri tom u patohistološkom smislu najuvjerljiviji učinak pokazuje kombinirana terapija s višom dozom BMP1-3Ab jer ne dozvoljava razvoj ciroze (fibroza napreduje do stadija septalne-premoštavajuće fibroze). Isto vrijedi za BMP-7 u lijevom režnju, dok u SR BMP-7 kod dijela životinja zaustavlja fibrogenezu u stadiju septalne fibroze (2-3/4) dok se kod drugih razvija početna ciroza. Osim patohistološki definiranog stadija fibroze značajne prognostičke implikacije ima i količina vezivnog tkiva u jetri (239) koja može značajno varirati unutar istog histološkog stadija, pa je ona posebno kvantificirana primjenom morfometrijske analize relativne zastupljenosti kolagena u preparatu. Rezultati morfometrijske analize pokazali su konzistentno za oba jetrena režnja značajan antifibrozo učinak BMP-7, BMP1-3Ab u višoj dozi, te njihove kombinacije u odnosu na kontrolnu skupinu. Najjači antifibrozo učinak procijenjen ovom metodom pokazuje BMP-7, te je on značajno učinkovitiji u prevenciji razvoja fibroze od kombinirane terapije ukoliko se morfometrijski analizira lijevi režanj ($p < 0,001$), dok u srednjem režnju nije bilo razlike između ovih dvaju modaliteta ($p = 0,095$). Nije nađena statistički značajna razlika u učinkovitosti antifibroznog djelovanja između BMP-7 i više doze BMP1-3Ab za oba režnja ($p = 0,056$ za LR i $p = 0,063$ za SR). Izostao je učinak male doze monoterapije BMP1-3Ab i kombinirane terapije BMP-7 + BMP1-3Ab u maloj dozi pri čemu se kod prve čak bilježi blago povećanje količine kolagena u odnosu na kontrolnu skupinu, no razlika nije bila statistički značajna.

Rezultati određivanja koncentracije hidroksiprolina među skupinama odudaraju od patohistoloških i rezultata morfometrijske analize. Razlog tome je vjerojatno metodološke prirode. Naime, kako se hidroksiprolin određuje iz homogenizata tkiva jetre obaju režnjeva, te kako je nemoguće prilikom uzorkovanja biti siguran da se u preparatu ne nalazi neka veća krvna žila, postoji mogućnost da količina kolagena iz stijenke takve žile u bitnoj mjeri utječe na rezultat između pojedinih životinja. Zbog toga je moguće da određivanje hidroksiprolina nije dovoljno osjetljiva

metoda za uočavanje finih razlika u količini vezivnog tkiva u jetri, o čemu postoje i literaturni navodi (241, 242) no ipak može poslužiti za grublju orijentaciju, jer se primjerice pokazalo da postoji značajna razlika između zdravih životinja i kontrolnih životinja s cirozom. Morfometrijskom analizom izbjegavaju se problemi koji limitiraju vrijednost metode određivanja hidrokspiroolina jer je moguće na preparatu prepoznati presjeke kroz veće krvne žile, te analizom obuhvatiti samo parenhimske promjene čime se dobivaju precizni podaci o količini tkivne fibroze.

Analiza genske ekspresije provedena je usporedbom pojedinih intervensijskih sa kontrolnom skupinom preventijskog dijela pokusa. Značajna razlika u jačini genske ekspresije između skupina uočena je za gene *Coll1A1*, *Tgfb1*, *α Sma*, *Fmod*, *Chordin*, *Bmp2*, *Bmp4* i *Bmp6* (za sve $p \leq 0,01$), dok nije bilo razlike za *Bmp1* i *Bmp7* gen. Sukladno rezultatima morfometrijske analize primjena BMP-7 proteina dovela je do značajnog smanjenja ekspresije *Coll1A1*, *Tgfb1* i *α Sma* gena, te se može zaključiti da se antifibrozni učinak BMP-7 ostvaruje njegovim inhibitorynim djelovanjem na HSC, ekspresiju TGF β 1 i sintezu kolagena, pri čemu smanjenje sinteze kolagena moguće nastaje posredno kao posljedica smanjenja aktivacije HSC.

Primjenom BMP1-3Ab u višoj dozi značajno se smanjuje ekspresija *Coll1A1* i *Tgfb1*, dok izostaje učinak na ekspresiju *α Sma* gena. Istovremeno mala doza BMP1-3Ab značajno smanjuje samo ekspresiju *Tgfb1* gena, dok nema značajnog učinka na jačinu ekspresije *Coll1A1* i *α Sma* gena pri čemu se kod posljednjeg uočava trend porasta u odnosu na kontrolnu skupinu. Imunohistokemijskom analizom tkivne ekspresije BMP1-3 proteina nađena je značajna razlika između skupina ($p=0,005$) s tim da je u svim skupinama tim putem određena količina proteina u tkivu bila mala, tj. u rasponu od 0-1 bod na skali od 0-3. U niti jednoj od intervensijskih skupina nije uočeno značajno smanjenje tkivne ekspresije BMP1-3 proteina u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako je medijan ekspresije u kontrolnoj skupini bio 0,5, to je u post-hoc analizi uočena značajna razlika između pojedinih intervensijskih skupina međusobno, jer je kod nekih došlo do smanjenja jačine signala u odnosu na kontrolu (primjerice u skupini tretiranoj s BMP-7 gdje je medijan ekspresije BMP1-3 bio 0), a kod drugih do pojačanja (obje skupine koje su dobivale kombiniraju terapiju s različitim dozama BMP1-3Ab). Neočekivano, kod primjene niže doze BMP1-3Ab (2,5 μ g/kg) nađena je slabija jačina signala za BMP1-3 protein u jetri (medijan 0) u odnosu na višu dozu (medijan 1). Kod primjene niže doze BMP1-3Ab jačina signala u tkivu (medijan 0) bila je značajno manja u odnosu na monoterapiju višom dozom protutijela (medijan 1), te kombiniranu terapiju s obje doze protutijela (medijan 1 za obje doze). Analizom ekspresije *Bmp1* gena nije nađena razlika između svih skupina koje se uključene u preventijski dio pokusa, iako se uočava nešto niža vrijednost genske ekspresije u skupini koja je dobivala BMP1-3Ab u niskoj dozi. Temeljem ovih rezultata, kao i rezultata morfometrijske analize moglo bi se zaključiti da se učinci BMP1-3Ab u prevenciji razvoja jetrene fibroze razlikuju ovisno o primjenjenoj dozi. Doza BMP1-3Ab 2,5 μ g/kg nema antifibrozni učinak, tj. čak dovodi do blažeg povećanja količine kolagena u odnosu na kontrolnu skupinu. Pri tom ova doza protutijela značajnije smanjuje tkivnu ekspresiju BMP1-3 proteina u odnosu na dozu od 15 μ g/kg, dok ekspresija *Bmp1*

gena, iako niža, nije značajno različita u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod primjene ove doze protutijela značajno se smanjuje ekspresija *Tgfb1* gena, dok se ekspresija *Coll1A1* i *aSma* gena značajno ne mijenjaju iako se uočava trend porasta ekspresije *aSma* gena. Suprotno tome primjena BMP1-3Ab u dozi 15 µg/kg ima značajno antifibrozo djelovanje usporedivo s onim koje pokazuje BMP-7. Pri tom se kod primjene ove doze BMP1-3Ab značajno smanjuje ekspresija *Coll1A1* i *Tgfb1* gena, dok nema značajne razlike u ekspresiji *aSma* i *Bmp1* gena u odnosu na kontrolnu skupinu. Može se zaključiti da antifibrozni učinci protutijela na BMP1-3 nastaju kao posljedica inhibicije djelovanja BMP1-3 proteina u procesu sazrijevanja kolagena, te su vjerojatno posredovani i promjenama na genskoj razini jer dovode do smanjenja ekspresije gena za kolagen tipa 1 i TGFβ1, dok nemaju učinka na aktivaciju HSC. Iz ovih rezultata ne može se jasno pretpostaviti mehanizam koji bi povezoao inhibiciju BMP1-3 proteina i učinke primjene protutijela na genskoj razini, no čini se da oni nisu u svezi s količinom proteinske ekspresije (ili jačinom inhibicije) BMP1-3 u jetri, već se to djelovanje moguće odvija posredovanjem drugih molekula i mehanizama. Za razjašnjenje ovih nepoznanica trebalo bi primijeniti još osjetljivije metode za proučavanje proteinske ekspresije na tkivnoj i staničnoj razini, primjerice Western-blot ili proteomske metode zasnovane na masenoj spektrometriji, te istražiti zastupljenost pojedinih izoformi BMP-1 proteina u odrasloj štakorskoj jetri i dinamiku njihove genske i proteinske ekspresije u procesu fibrogeneze nativno i u prisutnosti inhibirajućih protutijela.

Najveća i ujedno statistički jedino značajna ekspresija gena za Fibromodulin zabilježena je u skupini koja je dobivala kombiniranu terapiju BMP-7 + BMP1-3Ab u dozi 15 µg/kg koja je ujedno i skupina u kojoj je zabilježen najbolji antifibrozni učinak ukoliko se fibroza kvantificira kategorijski kao histološki stadij, te značajan učinak ukoliko se fibroza kvantificira morfometrijski. Nije jasno zašto u drugim skupinama koje su pokazale značajan antifibrozni učinak (BMP-7, BMP1-3Ab u višoj dozi) također nije došlo do značajnog porasta ekspresije *Fmod* gena iako je kod primjene BMP-7 proteina ekspresija *Fmod* gena bila viša (3x) u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije dostigla statističku značajnost ($p=0,067$).

Nije bilo značajne razlike u ekspresiji *Bmp7* gena među skupinama, dok je imunohistokemijski postojala razlika u jačini tkivnog signala za BMP-7 protein na način da je on bio značajno jači u kontrolnoj skupini u odnosu na sve ostale. Ipak, ovdje treba uočiti da su apsolutne vrijednosti jačine tkivnog signala bile vrlo male, tj. u kontrolnoj skupini medijan je bio 0,5 (na skali 0-3) a u svim ostalim skupinama 0. Prema ranijim studijama u mišjoj i štakorskoj jetri nema endogene ekspresije BMP-7 ili je ona vrlo mala, no radi se o podacima dobivenim na zdravoj jetri, dok ekspresija *Bmp7* gena nije ispitivana u jetri s razvijenom fibrozom (26, 193). Prema citiranim studijama na animalnom modelu BMP-7 ima antifibrozo i regeneratorno djelovanje na jetru, dok rezultati dobiveni u jedinoj studiji na humanim uzorcima govore u prilog njegovom profibrogenom djelovanju (206). Naši rezultati ukazuju da u tijeku toksične lezije jetre i fibrogeneze dolazi do značajnog porasta genske ekspresije BMP-7, dok je tkivna ekspresija analizirana imunohistokemijski nešto veća u odnosu na

kontrolu, ali ne doseže statističku značajnost ($p=0,078$). Primjenom različitih terapijskih modaliteta ne dolazi do daljnjeg porasta ekspresije *Bmp7* gena, dok se proteinska ekspresija smanjuje. Iako postoji još nepoznanica vezanih uz fiziologiju BMP-7 u jetri iz navedenih rezultata moglo bi se zaključiti da je genska i proteinska ekspresija BMP-7 u zdravoj jetri vrlo mala, u tijeku jetrene lezije i fibrogeneze dolazi do značajnog porasta ekspresije *Bmp7* gena i blažeg, nesignifikantnog porasta BMP-7 proteina vjerojatno kao reparatorni odgovor na jetrenu leziju jer je prema većini citiranih studija, uključivo i našoj pokazano antifibrozo djelovanje BMP-7. Porast genske ekspresije BMP-7 tijekom toksične lezije jetre i fibrogeneze endogeno je uvjetovan patofiziološkim procesom i na njega se ne može dodatno djelovati primjenom rhBMP-7 proteina, BMP1-3Ab ili njihove kombinacije.

U odnosu na kontrolnu skupinu u svim intervencijskim skupinama osim one koja je dobivala BMP-7 došlo je do značajnog smanjenja ekspresije *Bmp6* gena. S obzirom da sve ostale skupine uključuju terapiju jednom od doza BMP1-3Ab moglo bi se zaključiti da je jedan od učinaka koji se ostvaruje djelovanjem BMP1-3Ab posredovan smanjenjem ekspresije *Bmp6* gena. Kako navedene terapijske skupine imaju različite učinke na fibrogenezu, a sam BMP-6 vjerojatno nema izravnog utjecaja na taj proces, ostvarene promjene u genskoj ekspresiji BMP-6 vjerojatno nisu relevantne za razvoj jetrene fibroze. Imunohistokemijskom analizom nije nađena značajna razlika u jačini signala BMP-6 proteina u jetri između navedenih skupina (medijan jačine signala=0 za sve skupine).

Ekspresija *Bmp2* gena bila je značajno niža u odnosu na kontrolu u skupinama koje su dobivale BMP1-3Ab u dozi 15 μ g/kg i kombiniranu terapiju BMP-7 + BMP1-3Ab u navedenoj dozi, dok razlika nije bila značajna između ostalih intervencijskih i kontrolne skupine. Iz ovih rezultata dalo bi se zaključiti da jedan od puteva kojim BMP1-3Ab u višoj dozi (kao i njegova kombinacija s BMP-7) ostvaruje svoje antifibrozo djelovanje uključuje i učinak na ekspresiju *Bmp2* gena, no ostaje otvoreno pitanje mehanizma kojim se ta interakcija odvija. Ekspresija *Bmp4* gena bila je značajno viša u skupini koja je dobivala malu dozu BMP1-3Ab i kombiniraju th. BMP-7 + viša doza BMP1-3Ab, dok se u ostalim skupinama nije razlikovala od kontrole. Ekspresija gena za chordin koji je endogeni inhibitor aktivnosti BMP-2 i BMP-4 molekula bila je značajno jača jedino u skupini koja je dobivala kombiniranu terapiju s višom dozom BMP1-3Ab. Sumarnom analizom ekspresijskih rezultata ova 3 gena vidi se da je jedino u skupini koja je dobivala kombiniranu th. s višom dozom BMP1-3Ab došlo do značajne promjene genske ekspresije svih triju gena što bi ukazivalo da se u ovoj terapijskoj skupini dio uočenog antifibroznog učinka odvija posredovanjem *Bmp2*, *Bmp4* i gena za Chordin.

Zadnji dio istraživanja odnosio se na analizu potencijalne učinkovitosti BMP-7 i/ili BMP1-3Ab na izazivanje regresije jetrene fibroze nakon prestanka primjene CCl₄. Nije bilo razlika u preživljenju između skupina, tj. sve životinje preživjele su cijelo vrijeme trajanja pokusa. Nakon 4 tjedna od prestanka primjene CCl₄ nije bilo značajne razlike u vrijednostima biokemijskih pokazatelja jetrene lezije (AST, ALT, bilirubin, albumin) između sve 4 skupine, što znači da primijenjeni terapijski modaliteti nisu imali značajnog utjecaja na ove parametre u odnosu na kontrolnu skupinu životinja koja nije dobivala nikakvu terapiju i kod koje se pratio prirodan tijek bolesti. Također nije bilo niti

razlike između skupina u prosječnom stadiju fibroze (medijan=4 za svaku od skupina) za oba režnja jetre, niti je bilo značajne varijabilnosti u stadiju fibroze između režnjeva u istoj skupini. Tek su se morfometrijskom analizom količine vezivnog tkiva, tj. kolagena u jetri uočile značajne razlike među skupinama uključenim u ovaj dio pokusa. U odnosu na kontrolnu skupinu, kod sve tri intervencijske skupine uočeno je značajno sniženje količine kolagena u LR jetre, s tim da je ono bilo najizraženije u skupini koja je dobivala BMP-7, pri čemu je statistički značajna razlika bila između skupine koja je dobivala BMP-7 i skupine koja je dobivala BMP1-3Ab ($p=0,041$). U srednjem režnju značajna redukcija količine vezivnog tkiva uočava se kod skupine koja je dobivala BMP-7 i kombiniranu terapiju, ponovo s najboljim učinkom BMP-7, a on je bio značajno bolji u odnosu na druge dvije intervencijske skupine ($p<0,001$ prema BMP1-3Ab i $p=0,008$ prema kombiniranoj th.). Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji hidroksiprolina između skupina, makar je u skupini koja je dobivala kombiniranu terapiju uočen najveći trend pada u odnosu na kontrolu (17,84 vs 22,94 $\mu\text{g/g}$). Sumarno, ovi podaci nam govore da nakon prestanka primjene toksina i uvođenja terapije u periodu od 4 tjedna dolazi do regresije fibroze, što se očituje smanjenjem količine vezivnog tkiva, no bolest i dalje ostaje u predterapijskom stadiju, koji je u ovom slučaju ciroza. U analizi regresije fibroze ključnu ulogu imala je morfometrijska analiza, jer se samo na taj način mogla uočiti regresivna dinamika zbivanja u jetri nakon uvođenja terapije. Klasičnom patohistološkom procjenom uznapredovalosti fibroze korištenjem stadija kao kategorijske varijable, mogao bi se steći dojam da je primjenjena terapija neučinkovita. No, kao što je već naglašeno, dijagnoza ciroze ne opisuje i njen stadij, tj. unutar patohistološkog entiteta ciroze postoji veliki raspon unutar kojega se nastavljaju odvijati patofiziološki procesi, a portalna hipertenzija koja dobro korelira s prognozom bolesti, također pokazuje dobru korelaciju s količinom vezivnog tkiva u jetri procijenjenom morfometrijski (239). Slijedom takvog razmišljanja evidentno je da BMP-7 i kombinirana terapija BMP-7 + BMP1-3Ab u dozi 2,5 $\mu\text{g/kg}$ imaju antifibrozo djelovanje i dovode do regresije fibroze kod životinja s već razvijenom cirozom, a nakon što je prethodno uklonjen etiološki agens odgovoran za nastanak ciroze. Samo uklanjanje etiološkog agensa ne dovodi do značajne regresije fibroze u promatranom periodu od 4 tjedna. Ovaj podatak je značajan za ona stanja u kojima se već razvila ciroza, a moguće je eliminirati uzročnika jetrene bolesti, tipičan primjer bio bi alkoholna bolest jetre. S obzirom na rezultate iz preventivnog dijela istraživanja moguće je da bi se opisani antifibrozo učinak vidio i kod onih oblika ciroze gdje nije eliminiran uzročni agens, no odgovor na to mogla bi dati jedino na takav način dizajnirana studija. U razmatranju rezultata regresije fibroze koji su dobiveni u ovom istraživanju treba uzeti u obzir činjenicu da je većina životinja prilikom randomizacije vjerojatno imala jetrenu leziju u stadiju početne ciroze i da je period intervencije nakon prestanka primjene CCl_4 bio relativno kratak. Predterapijski stadij fibroze kod životinja koje su uključene u terapijski dio pokusa procijenjen je na temelju rezultata patohistološke analize jetre životinja iz kontrolne skupine Pokusa A koje su kroz 14 tjedana pod istim uvjetima dobivale CCl_4 kao i sve životinje koje će biti randomizirane i uključene u terapijski dio pokusa. S obzirom da je kod životinja iz skupine Kontrola A nakon 14 tjedana primjene

CCl₄ medijan stadija fibroze po Nanji bio 4/4, tj. ciroza (7/8 životinja, a 1 je bila u stadiju 3/4) onda se smatralo da su i sve životinje koje su uključene u Pokus B imale isti histološki stadij, tj. medijan stadija 4. Relativno kratak terapijski period od 4 tjedna izabran je zbog toga što se prema ranijim studijama na štakorskom modelu toksične lezije jetre unutar prvih 8 tjedana od prestanka primjene toksičnog agensa odigraju praktično sve bitne reparatorne promjene u jetri: dolazi do stanjenja i djelomičnog kidanja vezivnih septuma, te regeneracije hepatocita sa stvaranjem makronodula umjesto mikronodula (120). Nakon 8 tjedana ne nastupaju bitnije regresivno-reparatorne promjene, a septalna fibroza s neovaskularizacijom vezivnih septuma ostaje trajna, ireverzibilna posljedica ranijeg zbijanja, tj. ciroze. Kraćim opservacijskim periodom pokušali smo zabilježiti promjene u jetri za vrijeme dok se one još aktivno odvijaju. Drugi razlog odabira perioda od 4 tjedna za trajanje ovog dijela pokusa bio je iz opreza da kod dužeg trajanja ne bi došlo do značajnije smrtnosti životinja, što bi onda potencijalno onemogućilo valjanu analizu rezultata. Razlog za oprez može se naći u činjenici da je prethodno trajanje primjene toksina već bilo prilično dugo, među najdužima u komparaciji s ostalim studijama koje su koristile ovaj model izazivanja jetrene lezije, a do sada nije ispitano djelovanje molekula BMP-7 i BMP1-3Ab kod životinja s cirozom (koje je moglo biti i potencijalno toksično).

U ovom dijelu pokusa uočena je značajna razlika među skupinama u ekspresiji *Coll1A1*, *Tgfb1*, *αSMA*, *Fmod*, *Bmp1* i *Bmp7* gena dok za gene *Chordin*, *Bmp2*, *Bmp4* i *Bmp6* nije bilo razlike između skupina. Primjena BMP-7 dovela je do značajnog smanjenja ekspresije *Coll1A1*, *Tgfb1*, *αSMA* i *Bmp1* gena, dok nije imala učinka na ekspresiju ostalih navedenih gena. Zajedno s rezultatom morfometrijske analize može se zaključiti da antifibrozo djelovanje BMP-7 kod već razvijene ciroze ostvaruje inhibicijom aktivacije HSC, djelovanja TGFβ1 i smanjenjem sinteze kolagena koja je moguće posljedica prvih dvaju učinaka. Također je inhibirana ekspresija *Bmp1* gena što je učinak koji nije zabilježen u preventivskom dijelu pokusa i koji bi također mogao doprinosti smanjenju stvaranja kolagena. Monoterapija s BMP1-3Ab u dozi 2,5μg/kg pokazala se učinkovitom u smanjenju fibroze samo u lijevom režnju, a na genskoj razini dovela je do smanjenja ekspresije samo *Tgfb1* gena, dok je došlo do porasta ekspresije *Fmod* i *Bmp7* gena. Kako niti imunohistokemijski nije nađena značajna razlika u jačini signala tkivne ekspresije BMP1-3 proteina između skupina ovog dijela pokusa, očito se određeno antifibrozo djelovanje BMP1-3Ab koje je uočeno u LR jetre ne može objasniti smanjenim učinkom samog BMP1-3 proteina, dok za utjecaj na ekspresiju ostalih navedenih gena vrijede objašnjenja navedena naprijed u dijelu gdje je razmatran antifibrozo učinak BMP1-3Ab u preventivskom dijelu pokusa. Kombinirana terapija s BMP-7 i BMP1-3Ab postigla je značajan antifibrozo učinak, a na genskoj razini uočava se smanjena ekspresija *Coll1A1* i *Tgfb1* gena, dok na ostale analizirane gene nije imala učinka.

Ekspresija *Bmp6* gena i proteina u tkivu jetre nije se značajno razlikovala između skupina uključenih u terapijski dio pokusa, pa se jednako kao i za preventivski dio može zaključiti da BMP-6 nema značajnu ulogu u razvoju niti regresiji jetrene fibroze, te da primjena BMP-7 proteina i BMP1-3Ab ne djeluju na njegovu ekspresiju.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu ulogu koštanih morfo-genetskih proteina i srodnih molekula u procesu razvoja jetrene fibroze i njene regresije nakon prestanka djelovanja štetnog agensa. U tijeku razvoja jetrene fibroze dolazi do značajnog povećanja ekspresije *Bmp7* gena što vjerojatno predstavlja obrambeni mehanizam jer se primjenom BMP-7 proteina u značajnoj mjeri smanjuje odlaganje kolagena u jetri, aktivacija hepatičnih stielatnih stanica i ekspresija *Tgfb1* kao jednog od ključnih medijatora u ovom procesu. U fazi oporavka jetre nakon prestanka štetnog djelovanja dolazi do značajnog smanjenja ekspresije *Bmp7* gena. Suprotno tome, ekspresija *Bmp2* i *Bmp4* gena smanjuje se za vrijeme razvoja fibroze, a značajno povećava u fazi oporavka jetre. Temeljem rezultata genske ekspresije u različitim fazama jetrene lezije i fibrogeze BMP-6 vjerojatno nema značajniju ulogu u ovom procesu. Ekspresija *Bmp1* gena blago je povećana u životinja s cirozom, dok u fazi oporavka dolazi do značajnog smanjenja njegove ekspresije, što se odvija istosmjerno s jačinom ekspresije gena za kolagen, TGFβ1 i αSMA, što je sukladno ulozi BMP-1 kao metaloproteinaze bitne u procesu sazrijevanja kolagena. Rezultati ovog istraživanja ukazuju i na potencijalne mogućnosti terapijske primjene BMP-7 i protutijela na BMP1-3 u prevenciji razvoja fibroze, te liječenju već razvijene uznapredovale fibroze/ciroze jetre. Najučinkovitije djelovanje u prevenciji razvoja fibroze pokazuju BMP-7 i BMP1-3Ab (15μg/kg), te njihova kombinacija. Antifibrozni učinci BMP1-3Ab ostvaruju se inhibicijom djelovanja BMP1-3 proteina u procesu sazrijevanja kolagena, a na transkripcijskoj razini praćeni su smanjenom ekspresijom gena za kolagen tipa 1 i TGFβ1, dok nemaju učinka na ekspresiju aktivacijskih biljega HSC. Terapijska primjena BMP-7 i kombinacije BMP-7 + BMP1-3Ab u dozi 2,5 μg/kg (ali ne i monoterapija BMP1-3Ab 2,5 μg/kg) ima značajno antifibrozo djelovanje dovodeći do regresije fibroze kod životinja s već razvijenom cirozom.

7. ZAKLJUČCI

1. Nakon 14 tjedana primjene CCl_4 kod svih životinja dolazi do razvoja ciroze ili uznapredovale septalne fibroze, što je praćeno značajnim porastom ekspresije *Coll1A1*, *Tgfb1* i *α Sma* gena odražavajući povećanu produkciju kolagena, TGF β 1 i aktivaciju hepatičnih stelatnih stanica. Nakon 4 tjedna od prestanka primjene CCl_4 ne dolazi do značajne spontane regresije fibroze, ali se bilježi značajno smanjenje ekspresije *Coll1A1* i *α Sma* gena.
2. Za vrijeme toksičnog djelovanja i razvoja fibroze dolazi do značajnog povećane ekspresije *Bmp7* gena, a nakon prestanka toksičnog djelovanja njegova se ekspresija smanjuje. Imunohistokemijskom analizom BMP-7 nije detektiran u zdravoj jetri, dok je u cirotičnoj jetri nađena blaga ekspresija, no razlika nije bila statistički značajna. Povećana ekspresija *Bmp7* u cirozi vjerojatno predstavlja obrambeni mehanizam s obzirom da rezultati genske ekspresije ukazuju kako primjena rhBMP-7 dovodi do smanjene aktivacije HSC, smanjene produkcije TGF β 1 kao jednog od glavnih medijatora fibrogeneze u jetri, te smanjene sinteze kolagena tipa 1.
3. Vremenska dinamika ekspresije *Bmp2* i *Bmp4* suprotnog je usmjerenja u odnosu na dinamiku ekspresije *Bmp7*, tj. smanjena je u tijeku razvoja jetrene lezije i fibrogeneze, a povećava se nakon prestanka djelovanja etiopatogenetskog čimbenika i možda u toj fazi potiču regeneraciju jetre barem u štakorskom modelu jetrene lezije uzrokovane djelovanjem CCl_4 .
4. Ekspresija *Bmp1* gena blago je povećana u životinja s cirozom, dok u fazi oporavka dolazi do značajnog smanjenja njegove ekspresije, što se odvija istosmjerno s jačinom ekspresije gena za kolagen, TGF β 1 i α SMA, što je sukladno ulozi BMP-1 kao metaloproteinaze bitne u procesu sazrijevanja kolagena.
5. Ekspresija gena i jačina tkivnog signala za BMP-6 protein ne razlikuju se značajno tijekom razvoja jetrene fibroze i u fazi oporavka u odnosu na zdrave životinje, iz čega se može zaključiti da ova molekula nema značajnu ulogu u procesu fibrogeneze u jetri.
6. U preventivskom dijelu pokusa primjenom BMP-7, BMP1-3Ab u dozi 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, te njihove kombinacije postignuto je značajno antifibrozo djelovanje u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, pri čemu nije bilo značajne razlike u djelotvornosti između BMP-7 i BMP1-3Ab.
7. Primjena BMP-7 proteina u preventivskom dijelu pokusa dovela je do značajnog smanjenja ekspresije *Coll1A1*, *Tgfb1* i *α Sma* gena, te se može zaključiti da se antifibrozni učinci BMP-7 u jetri ostvaruju njegovim inhibitornim djelovanjem na HSC, ekspresiju TGF β 1 i sintezu kolagena.

8. Učinci BMP1-3Ab na razvoj jetrene fibroze i ekspresiju proučavanih gena razlikuju se ovisno o primjenjenoj dozi. Samo BMP1-3Ab u dozi 15 µg/kg ima značajno antifibroзно djelovanje usporedivo s onim koje pokazuje BMP-7. Antifibrozni učinci BMP1-3Ab ostvaruju se inhibicijom djelovanja BMP1-3 proteina u procesu sazrijevanja kolagena, a na transkripcijskoj razini praćeni su smanjenom ekspresijom gena za kolagen tipa 1 i TGFβ1, dok nemaju učinka na ekspresiju aktivacijskih biljega HSC.

9. U terapijskom dijelu pokusa uočeno je da BMP-7 i kombinirana terapija BMP-7 + BMP1-3Ab u dozi 2,5 µg/kg (ali ne i monoterapija BMP1-3Ab 2,5 µg/kg) imaju značajno antifibrožno djelovanje dovodeći do regresije fibroze kod životinja s već razvijenom cirozom.

10. Na temelju rezultata genske ekspresije može se zaključiti da je antifibrožno djelovanje BMP-7 kod već razvijene fibroze posredovano inhibicijom aktivacije HSC, smanjenim stvaranjem TGFβ1 i kolagena, te inhibicijom ekspresije *Bmp1* gena čija promjena nije zabilježena u preventivskom dijelu pokusa. Kombinirana terapija s BMP-7 i BMP1-3Ab postigla je značajan antifibrozni učinak uz uočeno smanjenje ekspresije *Coll1A1* i *Tgfb1* gena.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Proučiti ulogu koštanih morfogogenetskih proteina (BMP) i srodnih molekula značajnih za biologiju izvanstaničnog matriksa (BMP-1) u procesima razvoja i regresije jetrene fibroze, kao i mogućnost njihove terapijske primjene.

Materijali i metode: Korišten je model eksperimentalno izazvane fibroze jetre u štakora primjenom CCl_4 . U preventivskom dijelu pokusa životinje su ($n=8$ po skupini) tijekom 14 tjedana uz CCl_4 dobivale i BMP-7, BMP1-3Ab ili njihovu kombinaciju, dok je u terapijskom pokusu ista terapija davana 4 tjedna životinjama s već razvijenom cirozom, a nakon prestanka primjene CCl_4 . Zastupljenost fibroze u jetri analizirana je histološki, morfometrijski i određivanjem koncentracije hidroksiprolina. Za analizu genske ekspresije u jetri korištena je qRT-PCR metoda. Imunohistokemijski je analizirana ekspresija proteina od interesa.

Rezultati: U cirozi je povećana ekspresija *Bmp7* i smanjenja *Bmp4* gena, dok u fazi oporavka značajno raste ekspresija *Bmp2* i *4*, a smanjuje se ekspresija *Bmp1* i *7* gena. Učinkovitost u prevenciji razvoja fibroze pokazuju BMP-7 i BMP1-3Ab ($15\mu\text{g}/\text{kg}$), te njihova kombinacija. Primjena BMP-7 i kombinacije BMP-7 + BMP1-3Ab ($2,5\mu\text{g}/\text{kg}$) dovodi do značajne regresije fibroze kod životinja s cirozom.

Zaključak: Koštani morfogogenetski proteini uključujući i BMP-1 igraju značajnu ulogu u procesu razvoja i regresije jetrene fibroze, pri čemu BMP-7 i BMP1-3Ab imaju antifibrozo djelovanje.

Ključne riječi: Koštani morfogogenetski protein-1; Koštani morfogogenetski protein-7; Ciroza jetre, eksperimentalna; Regeneracija jetre

8. SUMMARY

Aims: To analyze the role of bone morphogenetic proteins (BMP) and related molecules (BMP-1) during liver fibrosis (LF) development and regression and possibility of their therapeutic applicability.

Materials and methods: We used experimental model of CCl₄-induced rat LF. In the prevention arm the animals (8 per group) had received BMP-7, BMP1-3Ab or their combination along with CCl₄ for 14 weeks. In the therapeutic arm the same therapy had been administered for 4 weeks to rats with already established cirrhosis following the withdrawal of CCl₄. Amount of LF was assessed by histological, morphometric analysis and hydroxyproline determination. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR, and protein expression by immunohistochemistry.

Results: Increased *Bmp7* and decreased *Bmp4* gene expression was detected in cirrhotic liver, while the significant increase of *Bmp 2&4* and decrease of *Bmp1&7* was observed during the recovery phase. Effective prevention of LF development was achieved by the administration of BMP-7 or BMP1-3Ab (15µg/kg), or their combination. Administration of BMP-7 or BMP-7 + BMP1-3Ab (2,5 µg /kg) combination also led to significant regression of LF in previously cirrhotic rats.

Conclusion: Bone morphogenetic proteins including BMP-1 have important roles during LF development and regression while BMP-7 and BMP1-3Ab exert antifibrotic effects.

Key Words: Bone Morphogenetic Protein-1; Bone Morphogenetic Protein-7; Liver cirrhosis, experimental; Liver Regeneration

9. LITERATURA

1. Rockey DC, Friedman SL. Hepatic fibrosis and cirrhosis. U: Boyer TD, Wright TL, Manns, editors, 5th edition. Zakim and Boyer's hepatology, Vol 1. New York: Elsevier; 2006. Str. 87-109.
2. Lim YS, Kim WR. The Global Impact of Hepatic Fibrosis and End-Stage Liver Disease. *Clin Liver Dis* 2008(12): 733-746.
3. Graudal N, Leth P, Marbjerg L et al. Characteristics of cirrhosis undiagnosed during life: a comparative analysis of 73 undiagnosed cases and 149 diagnosed cases of cirrhosis, detected in 4929 consecutive autopsies. *J Intern Med* 1991; 230: 165-71.
4. Fattovich G, Giustina G, Degos F. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112: 463-72.
5. Bosetti, Levi F, Lucchini F et al. Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 2007; 46(5): 827-39.
6. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide . *J Hepatol* 2003; 39 (Suppl 1): S64-69.
7. Vong S, Bell BP. Chronic liver disease mortality in the United States, 1990-1998. *Hepatology* 2004; 39: 476-83.
8. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 1-16.
9. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
10. Kim WR, Brown RS Jr, Terrault NA et al. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002; 36: 227-42.
11. Freeman RB Jr, Steffick DE, Guidinger MK et al. Liver and intestine transplantation in the United States, 1997-2006. *Am J Transplant* 2008; 8: 958-76.
12. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon G, Tainturier MH et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38: 257-65.
13. Poynard T, Bedossa P, Opolon P, for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825-32
14. Bochud PY., Cai T, Overbeck K, Bochud M, Dufour JF, Mulhaupt B et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 51: 655-666.

15. Weber S, Gressner OA, Hall R, Grunhage F, Lammert F. Genetic determinant in hepatic fibrosis: From experimental models to fibrogenic gene signature in humans. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 747-57.
16. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglak L, Nickerson DA. Additional SNPs and linkage disequilibrium analyses are necessary for whole genome association studies in humans. *Nat Gen* 2003; 33: 518-21.
17. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-18.
18. Huang H, Shiffman ML, Friedman S et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46: 297-306.
19. Racanelli V, Rehermann B. The Liver as an Immunological Organ. *Hepatology* 2006; 43: S54-S62.
20. Wells R. Cellular Sources of Extracellular Matrix in Hepatic Fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 759-68.
21. Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 861-82.
22. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comparative Hepatology* 2007; 6: 7-20.
23. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-69.
24. Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; Where will it go? *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1024-35.
25. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99.
26. Zeissberg M, Yang C, Martino M, Duncan M, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;
27. Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-72.
28. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
29. Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y et al. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 138-46.

30. Song E, Ouyang N, Horbelt M et al. Influence of alternatively of classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 2000; 204: 19-28.
31. Chiamonte MG, Donaldson D.D., Cheever AW et al. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during T-helper type-2 dominated inflammatory response. *J Clin invest* 1999; 104: 777-85.
32. Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 2006; 130:1886-900.
33. Maher JJ, McGuire RF, Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990; 86(5): 1641-8.
34. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor beta 1. *J Cell Biol* 1998; 142(3): 873-81.
35. Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis of hepatitis C cirrhosis. *Clin Sci* 2007; 112: 141-55.
36. Bataller R, Paik YH, Lindquist JN et al. Hepatitis C virus core and non-structural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126: 529-40.
37. Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 622-34.
38. Poorten D, George J. Disease-Specific Mechanisms of Fibrosis: Hepatitis C virus and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 805-24.
39. Radaeva S, Sun R, Jaruga B et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006; 130: 435-52.
40. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 2003; 10 (Suppl1): S48-58.
41. Iken K, Huang L, Bekele H et al. Apoptosis of activated CD4+ and CD8+T cells is enhanced by co-culture with hepatocytes expressing hepatitis C virus (HCV) structural proteins through FasL induction. *Virology* 2006; 346: 362-72.
42. Zhan SS, Jiang JX, Wu J et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 435-43.
43. Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA et al. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via Toll-like receptor 9. *Hepatology* 2007; 46: 1509-18.

44. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 1324-32.
45. Mazzocca A, Sciammetta SC, Caloni V et al. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 11329-39.
46. Wu D, Zhai Q, Shi X. Alcohol induced oxidative stress and cell responses. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 (Suppl 3): S26-9.
47. Videla LA, Fernandez V, Tapia G et al. Oxidative stress mediated hepatotoxicity of iron and copper : role of Kupffer cells. *Biometals* 2003; 16: 103-111.
48. Svegliati-Baroni G, Inagaki Y, Rincon-Sanchez AR et al. Early response of alpha2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF-beta independent. *Hepatology* 2005; 42:343-52.
49. Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1313-19.
50. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L et al. Transforming growth factor beta 1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by hydrogen peroxide-C/EBP beta dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 960-70.
51. Grrenwel P, Tanaka S, Penkov D et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 912-8.
52. Grosh AK, Bhattacharyya S, Mori Y et al. Inhibition of collagen gene expression by interferon gamma: novel role of the CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta). *J Cell Physiol* 2006; 207: 251-60.
53. Ruef J, Rao GN, Li F et al. Induction of rat smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation* 1998; 97: 1071-8.
54. Nieto N. Oxidative stress and IL-6 mediate fibrogenic effects of rodent Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology* 2006; 44: 1487-501.
55. Urtasun R, de la Rosa LC, Nieto N. Oxidative and Nitrosative stress and Fibrogenic Response. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 769-90.
56. Edmison J, McCullough AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 75-104.
57. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H et al. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 2007; 56: 1124-31.
58. Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E et al. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 42: 1339-48.

59. Moreno M, Bataller R. Cytokines and Renin-Angiotensin System signaling in Hepatic Fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 825-52.
60. Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepato Res* 2003; 26:1-9.
61. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R et al. Silencing of TGF-beta signaling by the pseudoreceptor BAMBI, *Nature* 1999; 401 (6572): 480-5.
62. Rueger DC. Biochemistry of bone morphogenetic proteins. U Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice. urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; str. 1-18.
63. De Bleser PJ, Niko T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-β gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-93.
64. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto T, Mammoto T, Charyatan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964-8.
65. Xu CP, Ji WM, van den Brink GR, Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7621-5.
66. Novo E, Cannit S, Zamara E et al. Proangiogenic cytokines and hypoxia dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007; 170(6): 1942-53.
67. Yu C, Wang F, Yin C et al. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163(4): 1653-62.
68. Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK et al. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006; 168(5): 1500-12.
69. Rockey DC. Vascular mediators in the injured Liver. *Hepatology* 2003; 37: 4-12.
70. Terui Y, Saito T, Watanabe et al. Effect of angiotensin receptor antagonist on liver fibrosis in early stages of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36: 1022.
71. Yokohama S, Yoneda M, Haneda M et al. Therapeutic efficacy of angiotensin II receptor antagonist in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 40(5):1222-5.
72. Debernardi-Venon W, Martini S, Biasi F et al. AT1 receptor antagonist Candesartan in selected cirrhotic patients: effect on portal pressure and liver fibrosis markers. *J Hepatol* 2007; 46:1026-33.
73. Schepke M, Werner E, Biecker E et al. Hemodynamic effects of the angiotensin II receptor antagonist irbesartan in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology* 2001; 121: 389-95.

74. Siegmund SV, Schwabe RF. Endocannabinoids and liver disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294(2):G357-62.
75. Rappaport AM, McPhee PJ, Fisher MM et al. The scarring of the liver acini (cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virhows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 402: 107-37.
76. Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007; 45: 817-25.
77. Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16(3): 281-8.
78. Jeong WI, Do SH, Yun HS, Song BJ, Kim SJ, Kwak WJ et al. Hypoxia potentiates transforming growth factor beta expression on hepatocyte during the cirrhotic condition in rat liver. *Liver Int* 2004; 24: 658-68.
79. Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(S3): S88-S91.
80. Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. In *J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 43-54.
81. Zhang YP, Yao XX, Zhao X. Interleukin-1 beta up-regulates tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and phosphorylation of c-jun N-terminal kinase and p38 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(9): 1392-6)
82. Milani S, Herbst H, Schuppan D et al. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and-2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 528-37.
83. Kesteloot F, Desmouliere A, Leclercq I et al. ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 46: 1620-31.
84. Zhang Y, Ikegami T, Honda A et al. Involvement of integrin-linked kinase in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 2006; 44: 612-22.
85. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 351-72.
86. Gines P, Quintero E, Arroyo V. Compensated cirrhosis: natural history and prognosis. *Hepatology* 1987; 7:122-128.
87. Boyer TD. Portal hypertension and bleeding esophageal varices. U: Boyer TD, Wright TL, Manns, editors, 5th edition. *Zakim and Boyer's hepatology, Vol 1*. New York: Elsevier; 2006. Str. 347-82.

88. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-67.
89. Seef L. Natural history of hepatitis C. *Hepatol Rev* 2005; 2: 88-96.
90. Shiffman ML, Stewart CA, Hofmann CM, Contos MJ, Luketic VA, Sterling RK, Sanyal AJ. Chronic infection with hepatitis C virus in patients with elevated or persistently normal serum ALT levels: comparison of hepatic histology and response to interferon therapy. *J Infect Dis.* 2000; 182:1595-1601.
91. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of Hepatology* 2009; 8(1): S4-S8.
92. O'Shea RS, Dasarathy S, McCollough AJ. Alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 14-32.
93. Gines P, Schrier RW. Renal Failure in Cirrhosis. *N Engl J Med* 2009; 361:1279-90.
94. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006 (44): 217-31.
95. Pugh RN, Murray-Lyon IM; Dawson JL et al. Transection of the esophagus for bleeding esophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 649-54.
96. Propst A, Propst T, Zangerl G et al. Prognosis and life expectancy in chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1805-15.
97. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007; 47: 598-607.
98. Ishak K, Baptista A, Bianchi L et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696
99. Bedossa P, Poynard T, for the METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289-93.
100. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A et al. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 2006; 55(4): 569-78.
101. Strassburg CP, Manns MP. Approaches to Liver Biopsy Techniques-Revisited. *Semin Liver Dis* 2006; 26(4):318-27;
102. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(10): 2614-8.
103. Cholongitas E, Senzolo M, Standish R, Marelli L, Quaglia A, Patch D, Dhillon AP, Burroughs AK. A Systematic Review of the Quality of Liver Biopsy Specimens. *Am J Clin Pathol* 2006;125:710-721.
104. Guha IN, Rosenberg WM. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis: Serum Markers, Imaging and other Modalities. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 883-900.

105. Stauber RE, Lackner C. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2007; 13 (32): 4287-94.
106. Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology* 2006; 43: S113-S120.
107. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48: 835-47.
108. Friedrich-Rust M, Wunder K, Kriener S, Sotoudeh F, Richter S, Bojunga J, Herrmann E, Poynard T, Dietrich CF, Vermehren J, Zeuzem S, Sarrazin C. Liver Fibrosis in Viral Hepatitis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Imaging versus Transient Elastography. *Radiology* 2009; 252(2): 595-604.
109. Huwart L, Sempoux C, Salameh N, Jamart J, Annet L, Sinkus R, Peeters F, ter Beek LC, Horsmans Y, Van Beers BE. Liver fibrosis: Non invasive assessment with MR elastography versus aspartate aminotransferase-to-platelet ratio indeks. *Radiology* 2007; 245 (2): 458-66.
110. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.
111. Bismuth H, Krissat J. Surgery of liver tumors. U: Boyer TD, Wright TL, Manns, editors, 5th edition. *Zakim and Boyer's hepatology, Vol 2*. New York: Elsevier; 2006. Str. 1169-78.
112. Pinzani M, Vizzutti F. Fibrosis and cirrhosis reversibility: Clinical features and implications. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 901-13.
113. Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004; 40: 860-7.
114. Gieling RG, Burt AD, Mann DA. Fibrosis and Cirrhosis Reversibility-Molecular Mechanisms. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 915-37.
115. Falize L, Guillygomarc'h A, Perrin M et al. Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatology* 2006; 44(2): 472-7.
116. Wakim-Fleming J, Mullen KD. Long term management of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2005; 9:135-49.
117. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 981-5.
118. Bortolotti F, Guido M, Cadrobbi P et al. Spontaneous regression of hepatitis-B virus associated cirrhosis developed in childhood. *Dig Liver Dis* 2005; 37(12): 964-7.
119. Poynard T, McHutchinson J, Manns MP et al. Impact of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1303-13.

120. DiVinicius I, Baptista AP, Barbosa AA, Andrade ZA. Morphological signs of cirrhosis regression. *Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. Pathology-Research and practice*; 2005(201): 449-56.
121. Goodman ZD, Becker RL, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* 2007; 45: 886-94.
122. Rockey DC. Current and Future Anti-Fibrotic Therapies for Chronic Liver Disease. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 939-62.
123. Debernardi-Venon W, Martini S, Biasi F et al. AT1 receptor antagonist Candesartan in selected cirrhotic patients: effect on portal pressure and liver fibrosis markers. *J Hepatol* 2007; 46: 1026-33.
124. Schepke M, Werner E, Biecker E et al. Hemodynamic effect of the angiotensin II receptor antagonist irbesartan in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology* 2001; 121: 389-95.
125. Kim MY, Cho MY, Baik SK et al. The beneficial effect of angiotensin-blocking agent on liver fibrosis in patients with alcoholic liver disease: a randomised controlled trial. *J Hepatol* 2010; 52: S44, A97.
126. Weng HL, Wang BE, Jia JD et al. Effect of interferon gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 819-28.
127. Belfort R, Harrison SA, Brown K et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 2297-307.
128. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and nonalcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001; 21: 129-36.
129. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of Silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001; 61(14): 2035-63.
130. Ferenci P, Scherzer TM, Kerscher H et al. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. *Gastroenterology* 2008; 135 (5): 1561-7.
131. Lieber CS, Weiss DG, Groszmann R et al. Veterans Affairs Cooperative study on Polyenyphosphatidylcholine in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 1765-72.
132. Poupon RE, Lindor KD, Pares A. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 39:12-6.
133. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C et al. Long term Interleukin-10 therapy in chronic hepatitis C has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003; 38: 859-68.

134. Tilg H, Jalan R, Kaser A et al. Anti TNF-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003; 38: 419-25.
135. Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT et al. Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose Peginterferon. *N Engl J Med* 2008; 359(23): 2429-41.
136. Bruix J, Poynard T, Colombo M *et al.* Pegintron maintenance therapy in cirrhotic (Metavir F4) HCV patients who failed to respond to interferon/ribavirin (IR) therapy: final results of the EPIC3 cirrhosis maintenance trial [Oral presentation; 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, Denmark, 22–26 April, 2009].
137. Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF- β signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver International* 2006; 26: 8-22.
138. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
139. Vukičević S, Stavljenić A, Pećina M. Discovery and clinical applications of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 661-71
140. Martinovic S, Borovecki F, Smpath KT, Vukicevic S. Biology of bone morphogenetic proteins, u *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; str. 87-119.
141. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22: 591-603.
142. Kingsley DM. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8:133-46.
143. Griffith DL, Keck PC, Smpath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 878-883.
144. Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H. Murine osteogenic protein (OP-1): High levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 179: 116-123.
145. Rueger DC. Biochemistry of bone morphogenetic proteins. U *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; str. 1-18.
146. Demers C, Hamdy R. Bone morphogenetic proteins. *Science Medicine* 1999; 6: 8-17.
147. Nickel J, Dreyer M, Sebald W. Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. U: *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. Urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; str.61-85.
148. Korchynsky O, vanBezooijen RL, Lowik CWGM, tenDijke P. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation, u *Bone Morphogenetic*

- Proteins: Regeneration of Bone and beyond. Urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; str.9-44.
149. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of TGF-beta receptor. *Nature* 1994; 370:341-7.
 150. Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91.
 151. Heldin CH, Miyazono K, tenDijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997; 390: 465-71.
 152. Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Weiser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 1994; 14(6): 3810-21.
 153. tenDijke Y, Yamashita H, Sampath TK et al. Identification of type-I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 1994; 269: 16985-88.
 154. Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M et al. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 1996; 271: 21345-52.
 155. Sieber C, Schwaerzer GK, Knaus P. Bone morphogenetic protein signaling is fine tuned on multiple levels. U: *Bone Morphogenetic Proteins: From local to systemic therapeutics*. Urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008; str.281-114.
 156. Nakao A, Imamura T, Souchelnytski S, Kawabata M, Ishiki A, Oeda E, Tamaki K, Kanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β receptor mediated signalling through Smad 2, Smad 3, and Smad 4. *EMBO J* 1997; 16: 5353-62.
 157. Clement JH, Wolf S. Bone morphogenetic proteins and cancer. U: *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond*. Urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; str.267-292.
 158. Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K et al. Expression and localisation of bone morphogenetic proteins (BMP) and BMPs receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone* 1997; 21: 23-30.
 159. Imamura T, Takase M, Nishihara A et al. Smad 6 inhibits signaling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 1997; 389: 622-26.
 160. Nakao A, Afrakhte M, Moren A et al. Identification of Smad7, a TGF-beta inducible antagonist of TGF-beta signaling. *Nature* 1997; 389: 631-5.
 161. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998; 95: 737-40.
 162. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19: 1745-54.

163. Piccolo S, Ssi Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996; 86:589-598.
164. Tuschida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hsegawa Y, Sugino H. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J Biol Chem* 2000;275:40788-40796.
165. Lee HX, Ambrosio AL, Reversade B, DeRobertis EM. Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteases. *Cell* 2006; 124: 147-59.
166. Pappano WN, Steiglitz BM, Scott IC et al. Use of Bmp1/Tll1 double homozygous null mice and proteomics to identify and validate in vivo substrates of bone morphogenetic protein 1/tolloid like metalloproteinases. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4428-38.
167. Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 23: 218-35.
168. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R et al. Silencing of TGF-beta signaling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999; 401: 480-5.
169. Ibarrola N, Kratchmarova L, Nakajima D et al. Cloning of a novel signaling molecule, AMSH-2, that potentiates transforming growth factor beta signaling. *BMC Cell Biol* 2004; 5:2.
170. Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H et al. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* 2000; 103: 1085-97.
171. Verchueren K, Remacle JE, Collart C et al. SIP1 a novel zinc finger/homodomain repressor, interacts with smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 1999; 274: 20489-98.
172. Osada S, Ohmori SY, Taira M. XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad 1 in *Xenopus* embryos. *Development* 2003; 130: 1783-94.
173. Kretschamer M, Doody J, Masegüe J. opposing BMP and EGF signaling pathways converge on the TGF-B family mediator Smad1. *Nature* 1997; 389:618-22.
174. Shen ZJ, Nakamoto T, Tsuji K et al. Negative regulation of the bone morphogenetic protein/Smad signaling by Cas-interacting zinc finger protein in osteoblasts. *J Biol Chem* 2002; 277: 29840-6.
175. Vukicevic S., Kopp J.B., Luyten F.P., Smpath T.K. Induction of kidney mesenchyme by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7). *Proc Natl Acad Sci US* 1996; 93: 9021-9026.
176. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998; 106:160-166.

177. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-1594.
178. Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development. U: *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond*. Urednici Vukicevic S, Sampath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; str.73-108.
179. Duncan SA, Watt AJ. BMPs on the road to hepatogenesis. *Genes&Development* 2001; 15: 1879-84.
180. Willing MC, Pruchno CJ, Atkinson M, Byers PH. Osteogenesis imperfecta type I is commonly due to COL1A1 null allele of type I collagen. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 508-15.
181. Liaw L, Birk DE, Ballas CB et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J Clin Invest* 1998; 101:1468-78.
182. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003; 130: 2779-91.
183. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA et al. A role of smad 6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000; 24: 171-4.
184. Lyden D, Young AZ, Zagzag D et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularisation of tumour xenografts. *Nature* 1999; 401: 670-7.
185. Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, Tabin CJ. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalisation of the chick gut. *Development* 1998; 125: 2791-2801.
186. Zarret KS. Hepatocyte differentiation: from endoderm and beyond. *Curr Opin Gen Develop* 2001; 11:568-74.
187. Miralles F, Czernichow P, Ozaki K et al. Signaling through fibroblast growth factor receptor 2 plays a key role in the development of exocrine pancreas. *PNAS* 1999; 96: 6267-72.
188. Vukicevic S, Simic P, Grgurevic L, Borovecki F, Sampath K. Systemic administration of bone morphogenetic proteins. U: *Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics*, Izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008; str. 317-37.
189. Burkus JK. Clinical outcomes using rhBMP-2 in spinal fusion applications. U: *Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics*, Izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008; str. 71-80.
190. Friedlaender GE. Clinical experience of osteogenic protein-1 (OP-1) in the repair of bone defects and fractures of long bones. U: *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond*. Urednici Vukicevic S, Sampath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; str.157-62.

191. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Smpath TK, Oppermann H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J* 1990; 9: 2085-2093.
192. Vukicevic S., Latin V., Chen P., Batorsky R., Reddi A.H., Smpath T.K. Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: High affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 693-700.
193. Sugimoto H, Yang C, LeBleu VS, Soubasakos MA, Giraldo M, Zeisberg M, Kalluri R. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J* 2007; 21: 256-64.
194. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Bašić N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreymurthy B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffiths D, Maliakal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A, Smpath TK. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 1998; 102: 202-14.
195. Lefter AM, Tsao PS, Ma XL, Sampath TK. Anti-ischaemic and endothelial protective actions of recombinant human osteogenic protein (hOP-1). *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 585-93.
196. Chan CF, Lin SZ, Chiang YH et al. Intravenous administration of bone morphogenetic protein -7 after ischemia improves motor functions in stroke rats. *Stroke* 2003; 34: 558-64.
197. Lein P, Higgins D. Bone morphogenetic protein in the nervous system. U: Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond. Urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; str.245-66.
198. Sekiya T, Adachi S, Kohu K et al. Identification of BMP and activine membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 6840-6.
199. Katoh M, Terada M. Overexpression of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type. *J Gastroenterol* 1996; 31: 137-9.
200. Wen XZ, Miyake S, Akiyama Y, Yuasa Y. BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 100-6.
201. Liu X, Lee J, Cooley M et al. Smad7 but not Smad6 cooperate with oncogenic ras to cause malignant conversion in a mouse model for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 7760-8.

202. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 499-512.
203. Fan J, Shen H, Sun Y, Li P, Burczynski F, Namaka M, Gong Y. Bone morphogenetic protein 4 mediates bile duct ligation induced liver fibrosis through activation of Smad 1 and ERK 1/2 in rat hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2006; 207(2): 499-505
204. Knittel T, Fellmer P, Muller L, Ramadori G. Bone morphogenetic protein-6 is expressed in nonparenchymal liver cells and upregulated by transforming factor-beta 1. *Exp Cell Res*. 1997; 232: 263-9.
205. Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangolo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidine expression and iron metabolism. *Nat Genet*. 2009 Apr;41:482-7
206. Tacke F, Gäbele E, Bataille F, Schwabe RF, Hellerbrand C, Klebl F, Straub RH, Luedde T, Manns MP, Trautwein C, Brenner DA, Schölmerich J, Schnabl B. Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig Dis sci* 2007; 52:3404-15.
207. Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS. Bone Morphogenetic Protein-9 Binds to liver Cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 1995; 136: 4293-7.
208. Miller AF, Harvey SAK, Thies RS, Olson MS. Bone Morphogenetic Protein-9: An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem* 2000; 275 : 17937-45.
209. Breitkopf K, Dooley S. et al. Bone morphogenetic protein (BMP)-9: a new member of the TGF- β superfamily is secreted by activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2009 (50) Suppl 1: S110.
210. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.
211. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 1996;271:360-362.
212. Ge G, Greenspan D. Developmental Roles of the BMP1/TLD Metalloproteinases. *Birth Defects Research (Part C)* 2006; 78: 47-68.
213. Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biology* 2007; 508-23.
214. Stocker W, Gomisruth FX, Bode W, Zwillig R. Implications of the 3-D structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur J Biochem* 1993; 214: 215-31.

215. MacSweeney A, Gil-Parrado S, Vinzenz D et al. Structural basis for the substrate specificity of bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *J Mol Biol* 2008; 384: 228-39.
216. Baumann U. Crystal structure of the 50 kDa metalloproteinase from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol* 1994; 242: 244-51.
217. Bond J, Beynon RJ. The astacin family of metalloproteinases. *Protein Sci* 1995; 4: 1247-61.
218. Wermter C, Howel M, Hintze V et al. The protease domain of procollagen C-proteinase (BMP-1) lacks substrate selectivity which is conferred by non-proteolytic domains. *Bil Chem* 2007; 388: 513-21.
219. Shimell MJ, Ferguson EL, Childs SR et al. The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell* 1991; 67: 469-81.
220. Janitz M, Heiser V, Böttcher U, Landt O, Lauster R. Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. *J Mol Med* 1998; 76: 141-6.
221. Grgurevic L, Macek B, Healy D et al. Bone morphogenetic protein (BMP) 1-3 isoform circulates and regulates kidney function. *Kidney Int*, submitted.
222. Scott IC, Imamura Y, Pappano WN, Troedel JM, Recklies AD, Roughley PJ, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1 process proteoglycan. *J Biol Chem* 2000; 30504-11.
223. Wardle FC, Welch JV, Dale L. Bone morphogenetic protein 1 regulates dorso-ventral patterning in early *Xenopus* embryos by degrading Chordin, a BMP-4 antagonist. *Mech Dev* 1999; 86: 75-85.
224. Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding proteins. *J Cell Biol* 2006; 175:111-20.
225. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN et al. Activation of latent myostatin by BMP1/tolloid family of metalloproteinases. *PNAS* 2003; 100: 15842-6.
226. Moali C, Font B, Ruggiero F et al. Substrate specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1 dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J Biol Chem* 2005; 280: 24188-24194.
227. Zhang Y, Ge G, Greenspan DS. Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of alpha2-macroglobulin. *J Biol Chem* 2006; 281: 39096-39104.
228. Grgurevic L. Proteomska identifikacija koštanih morfogogenetskih proteina i njima srodnih molekula u biološkim tekućinama. Disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.

229. Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Lee IS. Reevaluation of Experimental Model of Hepatic Fibrosis Induced by Hepatotoxic Drugs: An Easy, Applicable and Reproducible Model. *Transpl Proc* 2008; 40: 2700-3.
230. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005; 117: 237-50.
231. Yorozu K, Fujii E, Teruya S. Lobular Differences in Fibrotic Changes in Rat Cirrhosis Model Induced by Carbon Tetrachloride. *J Toxicol Pathol* 2004; 17: 267-74.
232. On-line baza početnica za PCR analizu. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12159>
233. On-line program za dizajn početnica za specifične štakorske gene. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=NcbiHomeAd#
234. GeNorm normalization of real-time PCR expression data. On-line software. <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>
235. Smits K, Goossens K, Van Soom A et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine *in vivo* and fresh and frozen-thawed *in vitro* blastocysts. *BMC Research Notes* 2009; 2: 246.
236. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
237. Sheehan D, Hrapchak B, Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition, 1980, pp 189-190, Battelle Press, Ohio.
238. Nanji AA, Mendenhall CL, French SW. Beef fat prevents alcoholic liver disease in rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1989; 13: 15-19.
239. Calvaruso V, Burroughs AK, Standish R et al. Computer-assisted Image Analysis of Liver Collagen: Relationship to Ishak Scoring and Hepatic Venous Pressure Gradient. *Hepatology* 2009; 49: 1236-44.
240. Bergman A, Loxley R. Two improved and simplified methods for the determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 1963; 35: 1961-4.
241. Lee HS, Shun CT, Chiou LL, Chen CH, Huang GT, Sheu JC. Hydroxyproline content of needle biopsies as an objective measure of liver fibrosis; Emphasis on sampling variability. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1109-14.
242. Gomes AT, Bastos CG, Afonso CL et al. How variable are hydroxyproline determinations made in different samples of the same liver? *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 1160-3.
243. Broome U, Nemeth A, Hultcrantz R, Scheynius A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. *J Hepatol* 1997; 26: 857-62.
244. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F et al. A novel model of CCl₄ induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009; 51: 991-9.

245. Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A et al. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate Collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 2000; 151:779-87.
246. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994; 302: 527-34.
247. Burton-Wurster N, Liu W, Matthews GL et al. TGF beta 1 and biglycan, decorin and fibromodulin metabolism in canine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(3): 167-76.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen 19. rujna 1972.g. u Splitu, Republika Hrvatska.

Osnovna i Srednja škola: 1979-1991.g. Split

Dodiplomski studij: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1991-1997.g.
Prosjek ocjena 4,91.
Demonstratura: 3 godine Anatomija, 1 god. Histologija i embriologija,
1 god. Patofiziologija.

Poslijediplomski studij: Biomedicina i zdravstvo- znanstveni studij, 1999-2001. g.

Magisterij: „Korelacija polimorfizma gena za Interleukin-1 beta sa stupnjem i stadijem histoloških promjena u jetri bolesnika s kroničnim hepatitisom C“.
Mentor: Doc. dr. sc. Adriana Vince 29. 11. 2007.g.

Specijalizacija: Interna medicina, 2000-2004. g. KB «Dubrava».
Specijalistički ispit položio 2.7.2004.g.

Subspecijalizacija: Gastroenterologija, 2006-2008.g. KB "Dubrava"
Subspecijalistički ispit položio 10. 7. 2008.g.

Zaposlenje: KB «Dubrava», Zagreb, Klinika za unutarnje bolesti,
Zavod za gastroenterologiju, od 2000. g. do sada.

Usavršavanje u inozemstvu: Endoskopski ultrazvuk, lipanj 2006.g.
Universita di Bologna, Italia
Voditelj: Prof. dr. Giancarlo Caletti

Hepatologija i ultrazvuk, lipanj 2007.g.
(Stipendija Hrvatskog gastroenterološkog društva i UEGF)
Medizinische Hochschule Hannover, Njemačka
Voditelj: Prof. dr. Michael P. Manns

Članstvo u stručnim društvima:

Hrvatski liječnički zbor
Hrvatsko gastroenterološko društvo
Hrvatsko društvo za ultrazvuk u medicini i biologiji
European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology
European Association for the Study of the Liver

Oženjen, otac dvoje djece.

Publikacije:

Current Contents – 12 *in extenso* radova i 13 sažetka
Index Medicus/Excerpta Medica – 9 radova
Ostali kongresni sažeci- 45 sažetka

Radovi objavljeni u časopisima koji su indeksirani u Current Contents:

- 1) Pejša V, **Grgurević I**, Kušec R, Gaćina P. Rapid Decrease in High Titer of Factor VIII Inhibitors upon Immunosuppressive Treatment in Severe Postpartum Acquired Hemophilia A. Croatian Medical Journal 2004; 45(2): 410-13.
- 2) Pejša V, **Grgurević I**, Kujundžić M, Martinović M, Stančić V, Donley K, Pavletic S. No adverse effect of ABVD chemotherapy in a patient with chronic hepatitis C and Hodgkin disease. Wien Klin Wochenschr 2004; 116 (19/20): 695-697.
- 3) Pejša V, **Grgurević I**, Pažanin , Lang N, Grgurević L, Jakšić O. Multicentric glial brain tumors of a varying degree of differentiation in patient with chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol. 2005 May;79(1):50-3.
- 4) Tadić M, **Grgurević I**, Šćukanec-Špoljar M, Božić B, Marušić S, Horvatić I, Galešić K. Acute interstitial nephritis due to mesalazine. Nephrology (Carlton). 2005 Apr;10(2): 103-5.
- 5) Banić M, Sutlić Z, Biočina B, Kujundžić M, Fabijanić D, Ljubičić N, Pleško S, Buljevac M, Kardum D, Čabrijan Ž, **Grgurević I**, Urek M, Tadić M, Hulak V, Petrovečki M, Bedeniković V, Starčević B, Rotkvić I. Peptic ulcer disease in dyspeptic patients with ischemic heart disease: search and treat? Z Gastroentrol 2005; 43(6): 581-6.
- 6) **Grgurević I**, Vince A, Banić M, Buljevac M, Jeren B, Kes P, Kujundžić M, Leko N, Lukić IK, Slaviček J. Efficacy of interferon-alfa in the treatment of chronic hepatitis C in dialysis patients: two therapeutic protocols compared. Nephron Clin Pract. 2006; 103(1): c8-c11
- 7) **Grgurević I**, Buljevac M, Kujundžić M, Vukelić Marković M, Kardum D, Brkljačić B. Common bile duct wall thickening due to inramural varices diagnosed by colour doppler ultrasound. Ultraschall Med 2006; 27(5): 483-6.
- 8) Crncevic-Urek M, Bokun T, Kujundzic M, Banic M, Stoos-Veic T, **Grgurevic I**, Korica M. Leptomeninges as the first and only dissemination site of colorectal cancer. Int J Colorectal Dis. 2009; 24: 355-356.
- 9) Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtunecy O, Vince A, **Grgurevic I**, Bielawski KP, Zalewska M, Bock T, Ambrozaitis A, Stanczak J, Takács M, Chulanov V, Slusarczyk J, Drazd'áková M, Wiegand J, Cornberg M, Manns MP, Wedemeyer H. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. J Med Virol. 2008 Oct;80(10):1707-11.

- 10) Stoos-Veic T, Ajdukovic R, Jaksic O, **Grgurevic I**, Tomasovic-Loncaric C, Pejša V. Myelomatous ascites in patient with liver cirrhosis: A case report. *Diagn Cytopathol* 2009; 37 (10): 780-2.
- 11) Tadić M, Stoos-Veić T, Vukelić-Marković M, Curić J, Banić M, Cabrijan Z, **Grgurević I**, Kujundzić M. Endoscopic ultrasound in solid pancreatic masses-current state and review of literature. *Coll Antropol.* 2010 Mar;34(1):337-40.
- 12) **Grgurevic I**, Cikara I, Horvat J, Lukic IK, Heinzl R, Banic M, Kujundzic M, Brkljacic B. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis with Acoustic Radiation Force Impulse Imaging: Increased Liver and Splenic Stiffness in Patients with Liver Fibrosis and Cirrhosis. *Ultraschall Med* 2010; *in press*

Radovi objavljeni u ostalim indeksima:

- 1) **Grgurević I**, Gašparović V., Radonić R. Et al. Significance of Artificial Ventilation in Medical Intensive Care Unit. *Neurol. Croat.* 1998; 47 (1): 321-235.
- 2) Buljevac M, **Grgurević I**, Lacković Ž, Kujundžić M, Banić M. Duplex Ultrasonography in Diagnosis of Spigelian Hernia with Incarcerated Jejunal Loop. *Acta med. Croatica*, 2001; 55: 225-227.
- 3) **Grgurević I**, Buljevac M, Banić M, Čabrijan Ž, Crnčević-Urek M, Kardum D, Kujundžić M, Lešnjaković I, Tadić M, Lončar B. Doxycycline induced oesophageal ulcers: report of two cases and review of the literature. *Liječ Vjesn.* 2005; 127(11-12): 285-7.
- 4) Marušić S, **Grgurević I**. Nuspojave lijekova na sluznici jednjaka. *Pharmaca*, 2005; 43: 1-10.
- 5) **Grgurević I**, Banić M, Buljevac M, Čabrijan Ž, Kardum D, Kujundžić M, Lešnjaković I, Tadić M, Urek M, Brkljačić B. The role of endoscopic ultrasound in digestive tract diseases in era of advanced techniques of computed tomography. *Liječ Vjesn.* 2006; 128 (7-8): 217-24.
- 6) **Grgurević I**, Vince A, Kurelac I. Utjecaj čimbenika domaćina na progresiju jetrene fibroze kod bolesnika sa kroničnim hepatitisom C. *Infektološki Glasnik*, 2006; 2: 61-7.
- 7) **Grgurević I**, Pejša V, Morović-Vergles J, Dobrić I, Gašparović V, Tudorić N. Fatal toxic epidermal necrolysis and severe granulocytopenia following therapy with cefuroxime. *Acta Dermatovenerol Croat* 2008; 16(3): 133-137.
- 8) **Grgurević I**, Boozari B, Kujundžić M, Brkljačić B. Dopler jetrene cirkulacije. *Liječ Vjesn* 2009; 131: 211-217.

- 9) Banic M, Babic Z, Kujundzic M, Petricusic L, Crncevic Urek M, **Grgurevic I**, Kardum D, Bokun T. Video-capsule endoscopy-preliminary experience in the university hospital setting. Acta Med Croatica 2009; 63 (2): 159-64.